

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS EM REBANHOS BOVINOS NAS REGIÕES
SUDESTE E CENTRO-OESTE DO BRASIL**

Fernanda Dornelas Florentino Silva
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Janeiro de 2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE
ROTAVÍRUS EM REBANHOS BOVINOS NAS REGIÕES
SUDESTE E CENTRO-OESTE DO BRASIL**

Fernanda Dornelas Florentino Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro

Co-orientador: Prof. Dr. Samir Issa Samara

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

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Janeiro de 2012

S586o Silva, Fernanda Dornelas Florentino
Ocorrência e diversidade molecular de rotavírus em rebanhos
bovinos nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil / Fernanda
Dornelas Florentino Silva. -- Jaboticabal, 2012
x, 61 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientadora: Maria da Glória Buzinaro
Banca examinadora: Samir Issa Samara, Raul José Silva Girio,
Luis Guilherme de Oliveira
Bibliografia

1. Rotavírus – bovino. 2. Diarreia. 3. RT-PCR. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:614.4:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento de Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FERNANDA DORNELAS FLORENTINO SILVA- nascida em 18 de julho de 1983, no município de Lavras-MG, filha de Ernani Clarete da Silva e Lucilene Gomide Florentino Silva. Ingressou em março de 2002 no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Lavras (UFLA), concluindo-o em fevereiro de 2007. Trabalhou como veterinária de pequenos animais e responsável técnica na clínica veterinária Oriental no ano de 2009, em São Paulo. Em março de 2010 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, Câmpus de Jaboticabal (FCAV-UNESP – Jaboticabal), concluindo-o em janeiro de 2012.

“Que cada um considere a si mesmo, não como um homem procurando satisfazer sua própria sede de conhecimento [...] mas como um colaborador numa grande obra comum relacionada com os interesses supremos da humanidade.”

*Hermann Von Helmholtz
(1821-1894)*

Dedico esta dissertação ao meu pai Ernani por ser meu mestre a cada segundo da minha vida me ensinando a viver com dignidade, honestidade, inteligência, força e ser meu exemplo de perseverança em todos os momentos.

A minha mãe Lucilene por me fazer enxergar a vida com tanta alegria, amor, carinho e ternura. E por nunca me deixar desistir quando surgiram dificuldades. Ao meu irmão Felipe por seu companheirismo, afeto e também exemplo de força na minha vida.

Aos animais de todas as espécies e de todos os planetas os quais devo toda a minha dedicação e empenho, especialmente, a Pandorinha, Lolo e Matilde, que me ensinam a todo o momento a ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

À espiritualidade pela oportunidade de recomeçar, evoluir e guiar meus passos.

Aos meus tios Birinha e Dário por todo o carinho, atenção e sábios conselhos desde sempre.

À grande amiga Marcília que em pouco tempo me fez enxergar a vida de uma forma saudável e linda e me mostrou toda a força que tenho para viver.

À querida amiga Thaís Rocha pelo companheirismo, confiança e todo o carinho demonstrado durante o pouco tempo de convivência. Guardo você no meu coração.

Aos grandes amigos que mesmo a distância estão sempre no meu coração e acreditam na minha capacidade, especialmente, a Jamile, Janaína, e Clara Palagiano. E ao amigo Guilherme pelo respeito e consideração.

À família Dutra Pastor, especialmente à Naildinha e Eduardo, pelo acolhimento, carinho e amor.

À Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro pela oportunidade de realização do mestrado e projeto de pesquisa.

Ao professor Dr. Luis Augusto do Amaral, prof. Dr. Samir Issa Samara, prof. Dr. Raul José Silva Gírio Júnior e ao prof. Dr. Luís Guilherme de Oliveira, pelas sugestões e correções no exame geral de qualificação e defesa, resultando na versão final desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Fábio Gregori por toda a atenção, exemplo de profissionalismo e orientação em parte da realização deste trabalho.

À bolsista de iniciação científica, Ana Carolina Siqueira Gonçalves, pela colaboração nas coletas de amostras e análise de parte desta pesquisa.

Aos amigos do VPS-USP pelo incentivo, carinho e alegria.

Aos docentes, funcionários e colegas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Jaboticabal que direta ou indiretamente cooperaram na realização deste trabalho.

Aos veterinários e colegas que auxiliaram nas coletas das propriedades visitadas durante a pesquisa, especialmente aos Veterinários Renato e Marcelo (Itambé) e aos alunos de graduação Tiago, Gustavo, Thiago e Douglas da Universidade Federal de Goiás, Campus de Jataí.

À FAPESP, pela concessão de recursos financeiros (bolsa e auxílio) para a realização desta pesquisa.

Ao TEMPO, que apaga tudo que deve ser esquecido e eterniza o que realmente tem valor.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Considerações gerais.....	1
1.2. Patogênese da infecção por rotavírus e métodos de diagnóstico.....	5
1.3. Ocorrência de rotavírus em rebanhos bovinos.....	8
1.4. Justificativa.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Amostras fecais.....	15
3.2. Amostra padrão de rotavírus.....	20
3.3. Análise da presença de rotavírus por meio da técnica da EGPA.....	21
3.3.1. Preparo da suspensão fecal.....	21
3.3.2. Extração do RNA viral para EGPA.....	21
3.3.3. Preparo do gel de poliacrilamida.....	22
3.3.4. Coloração do gel com nitrato de prata.....	23
3.4. Genotipagem das amostras positivas.....	23
3.4.1. Extração do RNA dupla fita (dsRNA) de rotavírus bovino.....	24
3.4.2. Síntese do cDNA e reação em cadeia da polimerase.....	24
3.4.3. Multiplex “semi nested” PCR.....	25
3.5. Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Triagem das amostras de fezes de bezerros pela EGPA.....	28
4.2. Análise do perfil eletroforético do genoma de rotavírus pela EGPA.....	32

4.3. Classificação das amostras de rotavírus pela Multiplex “semi nested” RT-PCR.....	33
5. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES.....	46
7. REFERÊNCIAS.....	47

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Número total de animais separados pelo tipo de exploração do rebanho, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil	19
Tabela 2. Municípios, número de rebanhos e número total de animais de onde foram colhidas amostras fecais nos Estados de Minas Gerais e Goiás para análise da presença de rotavírus	19
Tabela 3. Municípios, número de rebanhos e número total de animais de onde foram colhidas amostras fecais nos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo para análise da presença de rotavírus	20
Tabela 4. Sequência dos iniciadores, localização no genoma dos rotavírus, comprimento do segmento amplicado e estirpes a partir das quais as sequências foram referenciadas	26
Tabela 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros de rebanhos bovinos leiteiros e de corte separados pelo Estado de procedência e tipo de exploração da propriedade no período de março de 2010 a agosto de 2011	28
Tabela 6. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, separados pelo tipo de exploração do rebanho, nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais	29
Tabela 7. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros de rebanhos de leite e de corte, segundo a consistência das fezes em rebanhos de municípios dos Estados de Minas Gerais e Goiás no período de março de 2010 a agosto de 2011	30
Tabela 8. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros de rebanhos de leite e de corte, segundo a consistência das fezes em rebanhos de municípios dos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo no período de março de 2010 a agosto de 2011.	31
Tabela 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção de rotavírus, de acordo com a faixa etária dos animais em bezerros de rebanhos leiteiros e de corte de municípios nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais no período de março de 2010 a agosto de 2011	32

Tabela 10. Tipos eletroforéticos de rotavírus distribuídos segundo os municípios de origem em bezerros de rebanhos de corte e leite dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás	33
Tabela 11. Distribuição dos genótipos G e P de 23 amostras do grupo A de rotavírus, caracterizados pela reação de multiplex “semi nested” RT-PCR a partir de material fecal de bezerros dos Estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais no período de março de 2010 a agosto de 2011	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) do genoma de rotavírus codificando proteínas estruturais. RNA dupla fita segmentado (A); proteínas codificadas por cada segmento genômico (B); partícula de rotavírus representada esquematicamente (C); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador (D).....	2
Figura 2. Municípios no Estado de Minas Gerais onde estavam localizados os rebanhos analisados para a presença de rotavírus, no período de março de 2010 a agosto de 2011.....	16
Figura 3. Municípios nos Estados Goiás onde estavam localizados os rebanhos analisados para a presença de rotavírus, no período de março de 2010 a agosto de 2011	16
Figura 4. Município no Estado do Mato Grosso do Sul onde estava localizado o rebanho analisado para a presença de rotavírus, no período de março de 2010 a agosto de 2011	17
Figura 5. Municípios no Estado de São Paulo onde estavam localizados os rebanhos analisados para a presença de rotavírus, no período de março de 2010 a agosto de 2011.....	17
Figura 6. Bezerreiro localizado no Estado de Goiás onde foram colhidas amostras fecais para análise da presença de rotavírus..	18
Figura 7. Amostra fecal sendo colhida diretamente da ampola retal de bezerro para análise da presença de rotavírus.....	18
Figura 8. Genotipos circulantes em rebanhos nos municípios onde foram detectadas amostras fecais positivas para rotavírus no Estado de Minas Gerais	35
Figura 9. Genotipos circulantes em rebanhos nos municípios onde foram detectadas amostras fecais positivas para rotavírus no Estado de São Paulo.....	36
Figura 10. Genotipos circulantes em rebanhos nos municípios onde foram detectadas amostras fecais positivas para rotavírus no Estado de Goiás	36

Figura 11. Fotografia em gel de agarose 1,2% mostrando o resultado da genotipagem das amostras BO/R 834 (1); NCDV-controle positivo (2); Controle negativo (5); BO/R 473 (10); para o genotipo G e P; L- marcador de peso molecular..... 37

**OCORRÊNCIA E DIVERSIDADE MOLECULAR DE ROTAVÍRUS EM BOVINOS
DE REBANHOS LEITEIROS E DE CORTE NAS REGIÕES SUDESTE E
CENTRO-OESTE DO BRASIL**

RESUMO: Rotavírus é uma importante causa de diarreia neonatal em humanos e em várias espécies animais, incluindo bezerros. O presente estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de rotavírus em bezerros de rebanhos leiteiros e de corte, durante o período de março de 2010 a agosto de 2011, em propriedades rurais situadas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. Foram analisadas 765 amostras de fezes de bezerros, na faixa etária entre um e 60 dias, de 56 rebanhos bovinos, sendo 53 de exploração leiteira e três de gado de corte. Pela técnica da eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), observou-se a ocorrência de rotavírus em 17,8% (10/56) dos rebanhos e em 3,0% (23/765) dos animais. A proporção de rebanhos leiteiros infectados foi de 16,9% (9/53), e no gado de corte o percentual de positividade foi de 33,3% (1/3). A maior ocorrência significativa de amostras positivas foi observada em animais na faixa etária de um a 15 dias, quando comparadas com as demais ($p < 0,01$). Foram diagnosticados bezerros infectados por rotavírus tanto em animais com sinais clínicos de diarreia (9,3%: 16/171) quanto naqueles clinicamente normais (1,1%: 7/594), existindo porém uma correlação positiva entre a presença da infecção e a manifestação clínica da diarreia ($p < 0,01$). Ao analisar o perfil do RNA extraído das 23 amostras positivas pelo EGPA foi possível classificá-lo em 4 eletroferotipos distintos, indicando grande diversidade genômica na região estudada. Os resultados indicaram a participação do agente na etiologia da diarreia dos bezerros. A genotipagem G e P das amostras positivas foi realizada pela técnica de RT-PCR e demonstrou que separadamente as associações de genótipos circulantes nos rebanhos do Estado de São Paulo foram G6P[11], G10[P11], G[-]P[5]+[11], G[-]P[6]. Nos rebanhos dos Estados de Minas Gerais e Goiás os

genótipos circulantes foram G6P[11], G8P[5], G11P[11] e G10P[11] e G6P[5] + P[11], G8P[11], G6P[11], G[-]P[1], G[-]P[11], respectivamente.

Palavras-Chave: Rotavírus, bovino, diarreia, RT-PCR

OCCURRENCE AND DIVERSITY MOLECULAR OF ROTAVIRUS IN DAIRY AND BEEF HERDS CATTLE IN BRAZILIAN SOUTHEAST AND CENTRAL-WEST REGIONS

SUMMARY: Rotavirus is an important cause of neonatal diarrhea in humans and several animal species, including calves. The present study aimed at verifying rotavirus occurrence in calves belonging to dairy and beef cattle herds during the period from March 2010 and August 2011, in farms located in the states of São Paulo, Minas Gerais, Goiás and Mato Grosso do Sul. It was analyzed 765 fecal samples of calves, from 1 to 60 days of age, belonging to 56 cattle herds (from which 53 were dairy and 3 were beef cattle). By the technique of electrophoresis with polyacrylamide gel (PAGE), the occurrence of rotavirus was observed in 17.8% (10 / 56) of herds and 3.0% (23/765) of the animals. The proportion of infected dairy cattle was 16.9% (9/53), and the percentage of positivity in beef cattle was 33.3% (1 / 3). The highest incidence of positive samples was observed in animals aged 1-15 days, compared to the others ($p < 0.01$). Calves infected by rotavirus were diagnosed not only in animals with clinical signals of diarrhea (9.3%: 16/171) but also in the clinically normal ones (1.1%: 7/594), although there is a correlation between the presence of infection and the clinical manifestation of diarrhea ($p < 0.01$). By analyzing the profile of RNA extracted from 23 positive samples by EGPA it was possible to classify it in four distinct electropherotypes, indicating a large genomic diversity in the analyzed region. The results indicate the agent's participation in the etiology of diarrhea in calves. The polymerase chain reaction (PCR) preceded by reverse-transcription (RT) of viral RNA was employed to characterize the bovine rotavirus genotypes G and P, which indicated that the associations of genotypes circulating in herds in Brazil's southeastern region were G6P[11], G10P[11], G[-]P[5] + [11], G[-]P[6] in the state of São Paulo and G6P[11], G8P[5], G11P[11], G10P[11] in the state of Minas Gerais. In the central-western region, the genotypes G6P[5] + [11], G8P[11], G6P[11], G[-]P[1], G[-]P[11], were detected in the state of Goiás.

Keywords: Rotavirus, bovine, diarrhea, RT-PCR

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A diarreia neonatal bovina é considerada uma das mais importantes enfermidades que acometem os bezerros em função dos seguintes fatores: ser a principal causa de morbidade e mortalidade em animais jovens; causar perdas econômicas e zootécnicas em razão dos custos com o tratamento e a profilaxia; aumentar a susceptibilidade a outras infecções e retardar o desenvolvimento com consequente morte dos animais (RADOSTITS et al., 2007).

O rotavírus pertencente ao grupo A além de ser uma das maiores causas de gastroenterite aguda em humanos acomete também várias espécies animais (ESTES & KAPIKIAN, 2007), apresentando maior importância epidemiológica em animais na faixa etária entre duas e oito semanas de idade, antes do desenvolvimento da imunidade ativa (KOHARA & TSUNEMITSU, 2000). O rotavírus também constitui uma causa importante de diarreia em muitas espécies de aves domésticas (DHAMA et al., 2009) e, em seres humanos, o agente é responsável por aproximadamente 611.000 mortes de crianças com menos de 5 anos de idade em todo o mundo (GLASS & PARASHAR, 2006).

A primeira descrição da presença do rotavírus em animais foi feita por MEBUS et al. em 1969, que demonstraram por intermédio da microscopia eletrônica a presença de partículas virais em amostras de fezes de bezerros com diarreia, as quais foram denominadas de NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Vírus). Em 1975, WOODE et al. realizaram o primeiro relato de rotavírus em fezes de suínos com diarreia. Desde então, inúmeros trabalhos têm sido publicados relacionando os rotavírus a gastroenterites em diversas espécies de mamíferos e de aves.

Os rotavírus são membros da família *Reoviridae* e pertencem ao gênero *Rotavirus*, o qual apresenta partículas com aspecto de roda, do latim *rota* derivando o nome de Rotavírus. A partícula viral é de simetria icosaédrica e mede aproximadamente

75 nm de diâmetro e não são envelopados. Apresenta capsídeo triplo formado por três camadas protéicas concêntricas, que foram designadas como capsídeo externo, intermediário e interno (*core*) que circunda o genoma viral (Figura 1) (ESTES, 2001; DHAMA et al., 2009).

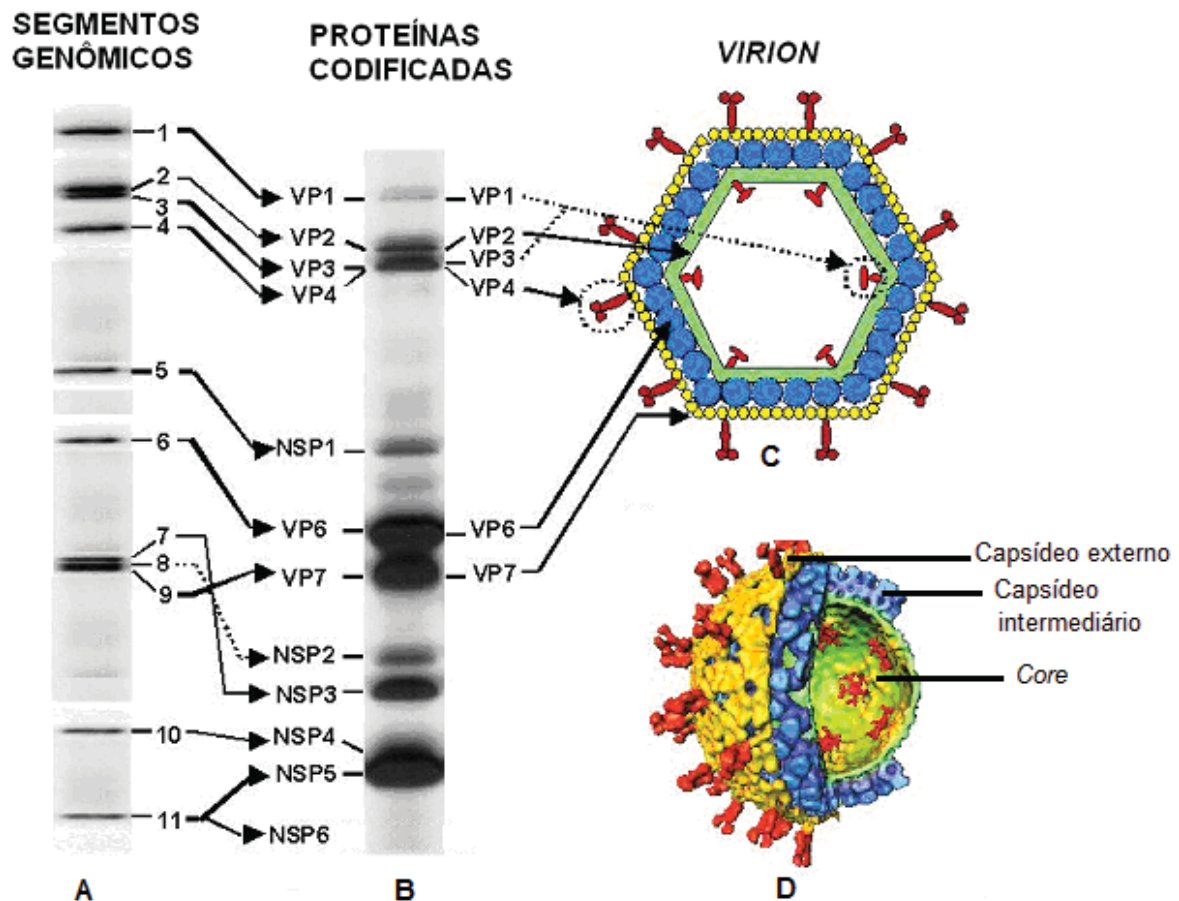


Figura 1. Eletroforese em gel de poliácridamida (EGPA) do genoma de rotavírus codificando proteínas estruturais. RNA dupla fita segmentado (A); proteínas codificadas por cada segmento genômico (B); partícula de rotavírus representada esquematicamente (C); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador (D).
Fonte: ESTES (2001). (Adaptado).

O material genético dos rotavírus é constituído por ácido ribonucléico (RNA) de fita dupla (dsRNA), com 11 segmentos, os quais codificam seis proteínas estruturais (VP1 a VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1 a NSP6)

(GREENBERG & ESTES, 2009). A Figura 1 apresenta os segmentos genômicos do rotavírus e as proteínas codificadas por cada segmento.

As proteínas estruturais são designadas VP “Viral Protein” seguidas por número sequencial na ordem decrescente da massa molecular. No *core* estão presentes as proteínas VP1 (125 KDa), VP2 (94KDa) e VP3 (88KDa); no capsídeo intermediário a VP6 (46KDa), e no capsídeo externo as proteínas VP4 (88KDa) e VP7 (38KDa). As proteínas não-estruturais, encontradas nas partículas virais maduras, recebem a denominação NSP “Non-Structural Protein” (ESTES & COHEN, 1989).

Os rotavírus apresentam três importantes especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipo. Este critério permite a classificação de múltiplos grupos (ou sorogrupos) e a existência de múltiplos sorotipos dentro de cada grupo (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996).

A especificidade de grupo é determinada pela proteína viral (VP6), classificando os vírus em sete grupos diferentes ou espécies (A a G) sendo que a maioria das amostras clinicamente significantes, em termos de prevalência animal e humana, pertence ao grupo A (RAMIG et al., 2005 ; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP6 também inclui antígenos responsáveis pela classificação em subgrupos I, II, Não-I/Não-II e I e II (GENTSCH et al., 1996; ESTES, 2001).

A classificação dos rotavírus em genótipos ou sorotipos G e P ocorre de acordo com as características genéticas ou antigênicas das proteínas VP7 e VP4 localizadas no capsídeo externo, respectivamente (DENNEHY, 2008). Estas proteínas também são responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes específicos. Nesse sistema, a proteína VP4 é referida como antígeno P (protease-sensível), e a proteína VP7 como antígeno G (glicoproteína) (ESTES, 2001). A proteína VP4, ainda, contém um sítio de clivagem pela tripsina e quando submetida ao tratamento com protease *in vitro* produz dois produtos, as proteínas VP5 e VP8, aumentando a infectividade do vírus (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

A caracterização genotípico-específica dos rotavírus é baseada nos resultados de reações de transcrição reversa (RT) seguidas pela reação em cadeia da polimerase

(PCR) ou pela análise da sequência de nucleotídeos. De acordo com as diferenças moleculares, já foram descritos pelo menos 25 diferentes genótipos G e 33 genótipos P (COLLINS et al., 2010, ESONA et al., 2010, ABE et al., 2011). Destes, G6, G8 e G10 são encontrados com maior frequência em bovinos, associados com P[1], P[5] e ou P[11] (FUKAI et al., 1999; GHOSH et al., 2008), apesar de já ter sido relatada a ocorrência dos sorótipos G1, G2 e G3 de rotavírus humano, e o sorótipo G11 de suínos (HUSSEIN et al., 1993).

Nos seres humanos, foram identificados os sorótipos G1 a G4, G6, G8, G9 e G12 (GERNA et al., 1990; ITURRIZA-GÓMARA et al., 2004.; YAMAMOTO et al., 2011). O sorótipo G5 foi identificado em suínos, equinos e bovinos, enquanto G7 e G11 foram relatados em aves e suínos (HOSHINO & KAPIKIAN, 1994). Posteriormente, foram descritos novos sorótipos identificados em equinos (G13 e G14) (BROWING et al., 1991; MONINI et al., 2011) e em bovinos (G15, G21 e G24) (RAHMAN et al., 2003; ABE et al., 2011).

Embora sejam considerados espécie-específicos, a ocorrência de transmissão interespecie dos rotavírus também é possível (RAHMAN et al., 2003). Vários estudos têm encontrado evidências antigênicas e moleculares de recombinação *in vivo* de diferentes estirpes de rotavírus do grupo A proveniente de humanos e de animais. Assim, os sorótipos humanos G1, G2, G3 e G8, bem como o sorótipo suíno G5 já foram identificados em bovinos (HUSSEIN et al., 1993; SATO et al., 1997), enquanto os sorótipos G6 e G10, característicos de bovinos, foram relatados em humanos (NAKAGOMI & NAKAGOMI, 1993; YAMAMOTO et al., 2011) e em suínos (MARTELLA et al., 2001).

As pesquisas sobre a variabilidade genética dos rotavírus fornecem dados úteis para o desenvolvimento de vacinas efetivas e monitoramento das medidas profiláticas (MARTELLA et al., 2010), bem como, o entendimento da epidemiologia do vírus, particularmente no que diz respeito às evidências de transmissão interespecie do rotavírus (STEYER et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2011), o que aumenta a possibilidade de surgimento de novas estirpes e combinações genotípicas incomuns.

1.2 Patogênese da infecção por rotavírus e métodos de diagnóstico

A porta de entrada para a infecção é a via oral, podendo ocorrer importante participação do ambiente tais como, água, alimentos e fômites como vias de transmissão (COOK et al., 2004). Apresentam tropismo por enterócitos maduros das porções média e alta das vilosidades do intestino delgado de animais e de humanos, em especial, nas regiões do duodeno e jejuno, se replicando no citoplasma e ocasionando alterações degenerativas (LUNDGREN & SVENSSON, 2001).

Em relação à replicação viral, de acordo com ZARATE et al. (2004), somente partículas com triplo capsídeo conseguem aderir-se às células do hospedeiro. A proteína VP4 tem função essencial no ciclo de replicação do vírus, incluindo a ligação ao receptor e a penetração celular. A função da VP7 durante a interação inicial não é bem estabelecida. A transcrição dos rotavírus e todas as demais atividades inerentes à replicação do genoma e montagem dos *virions* são realizadas por enzimas virais (IMAI et al., 1983).

É proposto que o processo de replicação do genoma dos rotavírus e a formação do *core* viral e das partículas com duplo capsídeo, ocorram em viroplasmas. O RNA transcrito atua diretamente na síntese das proteínas estruturais e não-estruturais dos rotavírus e também serve como molde do RNA para a síntese da fita negativa do material genético, formando o genoma segmentado do dsRNA (GONZALES et al., 2000). E através de estudos de microscopia eletrônica demonstrou-se que ao final do ciclo infeccioso a progênie viral é liberada por lise das células hospedeiras (ALTENBURG et al. 1980).

Apesar da predileção por enterócitos, evidências recentes demonstraram que a infecção do rotavírus do grupo A não é limitada às células epiteliais em animais e humanos. Estudos utilizando estirpes homólogas e heterólogas de rotavírus em animais experimentais (CRAWFORD et al., 2006; FENAUX et al., 2006), revelaram que o rotavírus quando recombinante causa viremia e infecções extraintestinais. O antígeno de rotavírus bovino do grupo A e RNA foram detectados em órgãos extra-intestinais e fluidos, incluindo fígado, pulmão e plexo coróide (KIM et al., 2011). Estes achados

confirmam outros recentes estudos que documentam a habilidade dos *virions* de propagarem na corrente sanguínea e se estenderem a órgãos extra-intestinais (CIARLET et al., 2002; BLUTT et al., 2003).

No caso da infecção nas células intestinais, a rápida perda de grande quantidade de células leva à substituição do epitélio colunar por enterócitos cuboidais ou escamosos, com predominância de células imaturas provenientes das criptas, resultando em atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas intestinais (SCOTT et al., 2004). Assim, durante a diarreia ocorre diminuição da digestão de açúcares e da absorção de sais minerais e água, aumentando a gravidade da doença (KAPIKIAN & CHANOCK, 1996), resultando nos sinais clínicos observados nos hospedeiros.

Na diarreia por rotavírus em bezerros as fezes apresentam coloração amarelo-pálida ou esbranquiçada em razão da alta concentração de leite não digerido. As manifestações clínicas são agudas e com período de incubação muito curto (de 12 a 96 horas) (STEELE et al., 2004). A enfermidade cursa com desidratação e acidose metabólica, e a ocorrência de piroxia é variável, mas quando ocorre normalmente é branda e pode ser sugestiva de infecção secundária por patógenos oportunistas (SCOTT et al., 2004).

Em neonatos, a taxa de mortalidade em razão da diarreia por rotavírus pode superar 80%, mas a maioria dos relatos sugere que varia de 5 a 20%, sendo superior em bezerros que receberam volume insuficiente de colostro ou que estão sob condições de estresse (DHAMA et al., 2009).

Com relação às características de persistência ambiental, os rotavírus apresentam elevada viabilidade, estimada em 60 ± 16 dias em esgoto comum (WHO, 2006); sete meses no meio ambiente (ESTES & KAPIKIAN, 2007); resiste a temperaturas de 60°C , bem como grande amplitude de pH, frente a uma diversidade de desinfetantes conhecidos (RAMOS et al., 2000). A variação do tempo que o vírus se mantém viável ocorre em função da temperatura e condições ambientais, fato este constatado por WALTER (2001) ao encontrar valores de persistência de 14 dias no verão e 200 dias no inverno na Alemanha.

Os bezerros podem excretar até 10^{10} partículas virais por grama de fezes durante a fase aguda da enfermidade, e essa excreção é contínua por 7-8 dias (MURPHY et al., 1999; ESTES, 2001), favorecendo a persistência do vírus no ambiente.

Segundo FLORES (2007), devido à semelhança com os sinais clínicos de infecções entéricas causadas por outros enteropatógenos, como bactérias, protozoários e vírus, o diagnóstico definitivo das rotavirose depende essencialmente da realização de testes laboratoriais.

O cultivo de rotavírus provenientes de amostras fecais em sistemas celulares de linhagem contínua tem pouco valor prático para o diagnóstico, por ser uma técnica laboriosa e exigir a manutenção de linhagens celulares que torna o procedimento oneroso (ALFIERI et al., 2007). Vários testes foram desenvolvidos visando a identificação do rotavírus, dentre eles a microscopia eletrônica (BISHOP et al., 1973), imunofluorescência e imunomicroscopia eletrônica (BRIDGER & WOODE, 1975), ensaio imunoenzimático (EIE) (ELLENS & DELEEUW, 1977; GREGORI et al., 2000), radioensaio (CUCKOR et al., 1978), co-aglutinação com proteína A do *Staphylococcus aureus* (DURIGON et al., 1991), contraímuno-eletoforese (CANDEIAS et al., 1978); reação em cadeia da polimerase precedido por transcrição reversa (RT-PCR) (GOUVEA et al., 1990; TANIGUCHI et al., 1992) e "real-time" RT-PCR (SCHWARZ et al., 2002).

Apesar de ter uma execução relativamente complexa, dificultando o processamento em grande quantidade de amostras (JEREZ, 1997), a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) tornou-se uma importante técnica laboratorial e epidemiológica na caracterização das amostras de vírus. Consiste em extrair o RNA viral e observar os segmentos genômicos de acordo com a sua mobilidade eletroforética (HERRING et al., 1982), permitindo a detecção do rotavírus de qualquer grupo (ESTES & KAPIKIAN, 2007) e dispensando o desenvolvimento de reagentes imunológicos.

Com relação às reações sorológicas, a técnica de ELISA ("enzyme-linked immunosorbent assay") é uma das mais empregadas em razão de sua alta

sensibilidade, praticidade e pela possibilidade de analisar um grande número de amostras em menor tempo (DHAMA et al., 2009), mas depende diretamente da qualidade dos anticorpos empregados e de sua disponibilidade (BEARDS et al., 1984; GREGORI et al., 2000). Embora o ELISA seja um método eficiente para detecção do agente, é importante que haja outras técnicas confirmatórias da presença do vírus (MARKOWSKA et al., 1996).

A genotipagem por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase precedido por transcrição reversa é indispensável para o monitoramento dos genótipos de rotavírus envolvidos em diarreias. Destaca-se pelo fornecimento de importantes informações epidemiológicas, como distribuição sazonal dos genótipos, co-circulação de diferentes genótipos, frequência de infecções mistas, determinação de estirpes de genótipos não identificados e novos genótipos. Considerando-se que os rotavírus apresentam distribuição mundial e grande diversidade de hospedeiros, o monitoramento também fornece dados relativos à caracterização de infecções interespecíficas (CONNER, MATSON & ESTES, 1994).

1.3 Ocorrência de rotavírus em rebanhos bovinos

A diarreia neonatal por rotavírus bovino tem uma epidemiologia complexa em razão da co-circulação de diferentes sorótipos do vírus em uma determinada área geográfica, primariamente causada por mudanças genéticas e por rearranjos genômicos (STEELE et al., 2004). O agente encontra-se disseminado mundialmente inclusive no Brasil, tendo sido descrito por diversos autores em animais e humanos (ALFIERI, 1999; GREGORI, 2003; KHAMRIN et al., 2007; STEYER et al., 2008; YAMAMOTO et al., 2011).

Muitos pesquisadores têm relatado a incidência e prevalência da infecção em bezerros variando de 7-98% mesmo que a taxa média tenha sido considerada de 30-40% (DHAMA et al., 2009). Nos Estados Unidos da América (EUA), taxas de prevalência tão altas como de 98% foram encontradas (SCHLAFER & SCOTT, 1979), enquanto na Itália relatou-se a prevalência de 90% (CASTRUCCI et al., 1988).

Estudos anteriores descrevem a prevalência da infecção por rotavírus, através das técnicas de ELISA, isolamento do rotavírus, EGPA e RT-PCR em diferentes países e demonstram a participação do agente na etiologia das diarreias em bezerros. Na Itália, foi caracterizada uma taxa de prevalência de 16,8% (PISANELLI et al., 2005); na Inglaterra, a prevalência foi de 67% (WOODE, 1976); na França, 45,1% (VENDE et al., 1999); na Irlanda, 91% (REIDY et al., 2006); na Índia, 46,2% (CHAUHAN & SINGH, 1996); na Holanda, 46% (DE LEEUW et al., 1980); nos EUA, 44% (CHINSANGARAM et al., 1995); na Turquia, 41,2% (GUMUSOVA et al., 2007); na Venezuela, 11,7%, (CIARLET et al., 1997) e na Suíça, 46% (LUGINBUHL et al., 2005).

MCNULTY & LOGAN (1983) identificaram o rotavírus em propriedades no Canadá em 79% das amostras de fezes examinadas de bezerros com e sem diarreia, sendo 42% dos casos com infecções subclínicas. Segundo os autores, estirpes de baixa virulência podem ser responsáveis pela manifestação subclínica da doença.

FIJTMAN et al. (1987) investigaram a presença de rotavírus em rebanhos leiteiros na Argentina por meio das técnicas de EGPA e EIE. Das 221 amostras de fezes de bezerros analisadas, sendo 59 de animais diarreicos e 152 de não diarreicos, encontraram 27,2% e 11,8% de casos positivos entre os animais com e sem diarreia, respectivamente.

Também na Argentina, estudos conduzidos por COSTATINI et al. (2002), utilizando as técnicas de ELISA e EGPA, encontraram 40% (452/1129) de positividade para rotavírus em amostras fecais de bezerros pertencentes a rebanhos bovinos leiteiros e de corte. Posteriormente, durante um período de 10 anos, 1581 amostras de fezes de rebanhos bovinos de leite e de corte foram colhidas, e 42% delas foram positivas para rotavírus por EIE na Argentina (GARAICOECHEA et al., 2006). Por RT-PCR foram detectados os genótipos G6P[5], predominante nos rebanhos de corte, além de G6 P[11] e G10 P[11], nos rebanhos leiteiros.

ISHIZAKI et al. (1995) relataram a prevalência de rotavírus em uma fazenda de gado de leite no Japão. Foram colhidas, semanalmente, amostras de fezes de bezerros do nascimento até oito semanas. Das 219 amostras colhidas, 14,6% foram positivas pela técnica de EGPA, concluindo que os animais entre duas e quatro semanas de

idade foram os mais acometidos pelo rotavírus. Outra observação importante foi a persistência de um único eletroferótipo, assim como a prevalência do sorotipo G6. Também no Japão, FUKAI et al. (1999), estudaram surtos de diarreia e detectaram a presença de rotavírus em 36,8% das 117 amostras colhidas. A genotipagem pela técnica de RT-PCR identificou os genótipos G8, G10 e G6+G8, dos quais o genótipo G8 foi o mais prevalente. A genotipagem P identificou os tipos P6[1], P7[5] e P8[1], além de infecções mistas.

A presença do rotavírus em bezerros assintomáticos também foi verificada, recentemente no Japão (ABE et al., 2009), num estudo onde foram coletados 171 amostras fecais de bezerros saudáveis até um ano de idade. As amostras foram analisadas usando a técnica de RT-PCR e 5,3% das amostras foram positivas para rotavírus. A análise de sequências parciais dos genes VP4 e VP7 indicaram que a maioria das amostras pertencia ao genótipo G10P[11]. E ainda, 77% das amostras foram positivas já no primeiro passo da PCR, o que indica considerável número de vírus excretado nas fezes normais, segundo os autores.

De acordo com DELEEUW et al. (1980), bezerros mais velhos e vacas adultas infectadas subclínicamente podem representar um papel importante na disseminação da doença para bezerros mais jovens e na manutenção da infecção dentro do rebanho. Em bezerros com evolução subclínica, os rotavírus podem ser excretados e se tornar uma fonte de infecção predispondo a ocorrência de surtos de diarreia (ABE et al., 2009).

O rotavírus também foi diagnosticado na Austrália num estudo de prevalência de patógenos entéricos em bezerros com diarreia de rebanhos leiteiros e de corte (IZZO et al., 2011). Dentre outros, o rotavírus foi o patógeno mais comum identificado em 477/597 (79,8%) das amostras através da técnica de RT-PCR.

No Brasil, vários estudos também abordam as características epidemiológicas e moleculares da infecção por rotavírus em bovinos.

ALFIERI et al. (2006) relataram taxa de prevalência de 19,4% de rotavírus bovino do grupo A nas fezes de bezerros diarreicos em diversas regiões brasileiras. Esses autores verificaram maior frequência de rotavírus do grupo A em animais no primeiro

mês de vida, sendo a ocorrência de amostras fecais diarreicas positiva após os 60 dias de idade, estatisticamente muito semelhante à das amostras de fezes com consistência normal.

Em 1987, JEREZ et al. verificaram elevada ocorrência de anticorpos anti-rotavírus bovino em um estudo realizado em 27 municípios do Estado de São Paulo, com uma frequência de ocorrência de 48%. E também no Estado de São Paulo, em um levantamento em rebanhos leiteiros, BUZINARO & FREITAS (2002) constataram que 9,9% das fezes diarreicas e 1,7% das fezes normais coletadas eram positivas para rotavírus bovino do grupo A, e que a maior frequência de infecção foi em bezerros com idade entre 16 e 20 dias.

Em dois estudos, um dos quais se realizou em 19 municípios do Estado de São Paulo e outro no município de Uruará, no Estado do Pará, foram constatadas soropositividades que variaram de 30% a 100%, respectivamente, em animais de diversas faixas etárias (BRANDÃO et al., 2002a; BRANDÃO et al., 2002b).

No Estado de Goiás, BRITO (1994) encontrou frequência de 7,17% de positividade para o rotavírus, sendo que foram caracterizados quatro tipos distintos de perfil eletroforético.

Atualmente, o conhecimento de genótipos/sorótipos do grupo A de rotavírus é considerado essencial para estabelecer mecanismos de vigilância epidemiológicos adequados e controlar infecções nas espécies mais comumente afetadas. Assim, com base na técnica de RT-PCR, vários estudos têm sido conduzidos no Brasil com a finalidade de determinar as características genotípicas das estirpes de rotavírus circulantes.

Em 1998, ALFIERI et al. caracterizaram os genótipos G e P de 20 amostras de rotavírus bovino do grupo A por meio da técnica de RT-PCR e identificaram os tipos G6P[5], G6P[1] e G10P[11] em 75%, 17% e 8% das amostras examinadas, respectivamente. Posteriormente, em 1999, ALFIERI utilizou a técnica de Multiplex PCR e determinou a frequência das infecções singulares, mistas e heterólogas, encontrando, respectivamente, 64%, 12% e 24% de cada uma das situações. Nesse estudo,

ressaltou também a maior frequência do genótipo G6P[5] (40%; 20/50) nas amostras analisadas.

BRITO et al. (2000) realizam classificação das estirpes circulantes no Estado de Goiás, utilizando a técnica de PCR, detectando infecções singulares e mistas, com a predominância dos genótipos G6 e G10, P[5] e P[11].

BARREIROS et al. (2000) realizaram a caracterização genotípica de 13 amostras positivas para rotavírus do grupo A. Nesse estudo, foram identificados os genótipos G6 P[1], G8 P[1] e G6 P[11]. Estes mesmos autores, em 2004, utilizaram a RT-PCR para a caracterização dos genótipos P e G de 71 amostras de rotavírus bovino do grupo A nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná, das quais 35 foram obtidas de rebanhos vacinados com vacina inativada G6 P[1]. Nos rebanhos não vacinados, foram detectados os genótipos G6 P[1], G8 P[1], G6 P[5] e G8 P[11], enquanto o genótipo G6 P[11], G6 P[5] e G8 P[11] predominaram nos rebanhos vacinados.

Ainda em 2004, ALFIERI et al. classificaram as estirpes circulantes utilizando a técnica de PCR em amostras de fezes de bezerros de rebanhos de leite e corte situados nos Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás e Paraná. Detectaram 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].

BUZINARO et al. (2009) determinaram a ocorrência de rotavírus do grupo A em 6,2% das amostras coletadas de bezerros de corte em propriedades rurais do Estado de São Paulo. A genotipagem pela RT-PCR revelou que as estirpes circulantes nos rebanhos eram G6P[5], G6P[11], G6P[5]+P[11] e G10P[11].

Mais recentemente, no Estado de Goiás, CARUZO et al. (2010), detectaram 9,9% de positividade em um estudo de 31 amostras positivas para rotavírus. Algumas estirpes foram caracterizadas pela “semi-nested” RT-PCR como G6P[1], G10P[11], G6P[11] e a maioria das amostras apresentou múltiplos genótipos P, incluindo tipos P[4] e P[6M], sugerindo a ocorrência de co-infecções e recombinação genética.

1.4 Justificativa

A análise da ocorrência e diversidade molecular dos rotavírus nas regiões do Brasil é de fundamental importância para a efetividade das medidas de controle implantadas, considerando a diarreia neonatal um dos principais problemas sanitários que afetam os rebanhos bovinos e a ampla diversidade genética destes agentes. Os rotavírus são apontados como importantes agentes etiológicos da diarreia em bezerros e este fato é confirmado pelos resultados dos estudos de ocorrência e caracterização molecular realizados no Brasil e em outros países no decorrer dos anos. A caracterização por genotipagem constitui, assim, um método indispensável ao estudo de fatores epidemiológicos das rotaviroses em grandes populações, além de propiciar informações ao desenvolvimento de vacinas.

2. OBJETIVOS

1. Estudar a ocorrência de rotavírus em amostras de fezes de bezerros de rebanhos bovinos em municípios dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul e Goiás.
2. Analisar o perfil eletroforético do genoma de rotavírus que forem identificados nessas amostras.
3. Realizar a caracterização dos genotipos G e P das amostras positivas para rotavírus pela técnica de RT-PCR com verificação da presença de infecções singulares, mistas e recombinações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras fecais

Foram utilizadas nesta pesquisa amostras de fezes de bezerros colhidas no período de março de 2010 a fevereiro de 2011, na faixa etária de 1 a 60 dias, com e sem quadro clínico de diarreia, provenientes de 53 rebanhos leiteiros e 3 rebanhos de corte, localizados em 6 municípios do Estado de São Paulo, 1 município do Estado do Mato Grosso do Sul, 6 municípios do Estado de Goiás e 14 municípios do Estado de Minas Gerais, conforme demonstrado nas (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6) e (Tabelas 1, 2 e 3). As amostras fecais foram colhidas diretamente da ampola retal (Figura 7), e foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em caixas isotérmicas refrigeradas até a chegada ao Laboratório de Diagnóstico de Rotavírus, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal (UNESP/Jaboticabal). Posteriormente, as amostras foram armazenadas à temperatura de -20°C , até o momento da análise laboratorial.

As amostras fecais de consistência líquida foram consideradas diarreicas, enquanto as fezes de consistência firme e pastosa foram classificadas como não diarreicas.

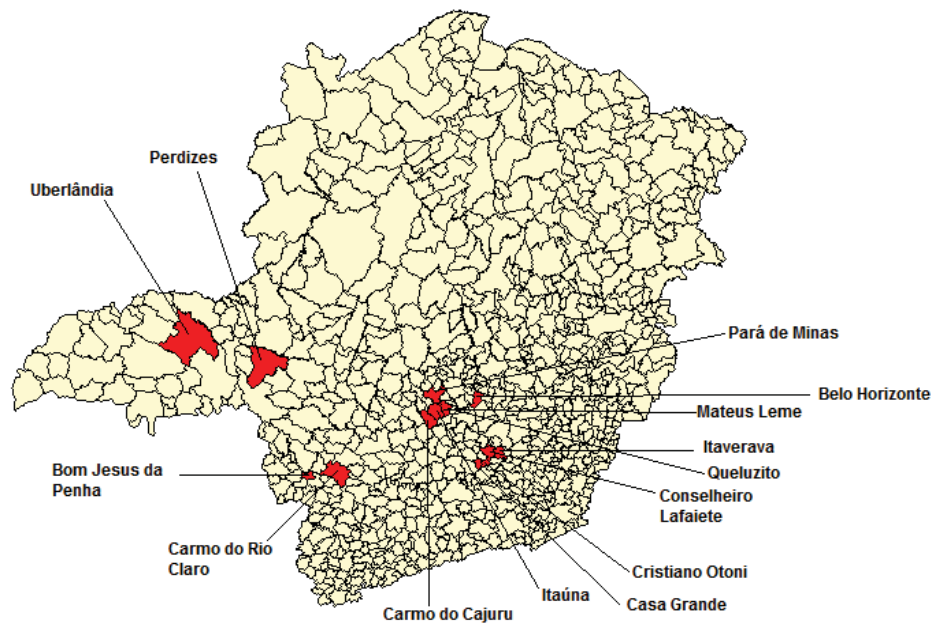


Figura 2. Municípios no Estado de Minas Gerais onde estavam localizados os rebanhos analisados para a presença de rotavírus, no período de março de 2010 a agosto de 2011.

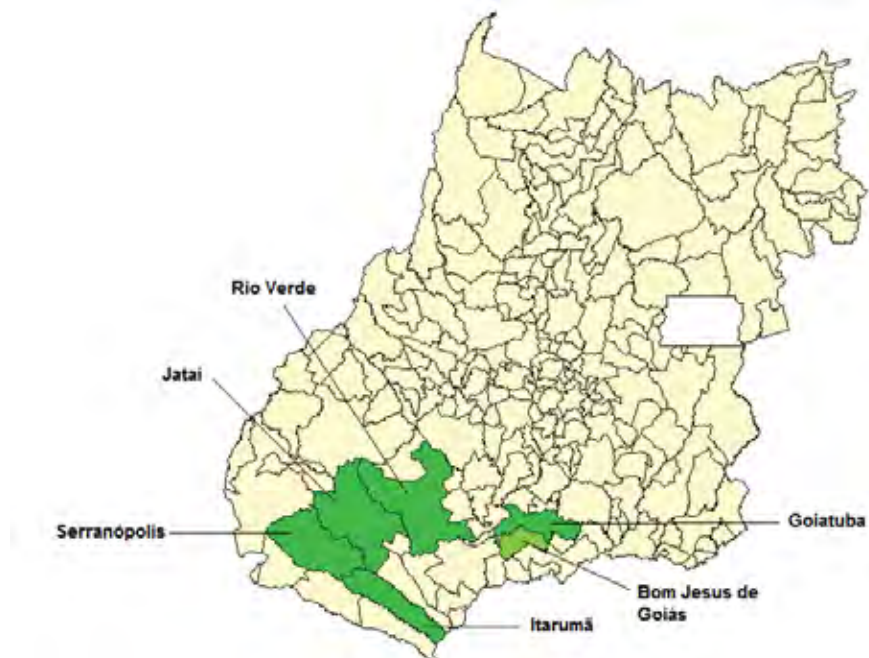


Figura 3. Municípios no Estado de Goiás onde estavam localizados os rebanhos analisados para a presença de rotavírus, no período de março de 2010 a agosto de 2011.



Figura 4. Município no Estado do Mato Grosso do Sul onde estava localizado o rebanho analisado para a presença de rotavírus, no período de março de 2010 a agosto de 2011.

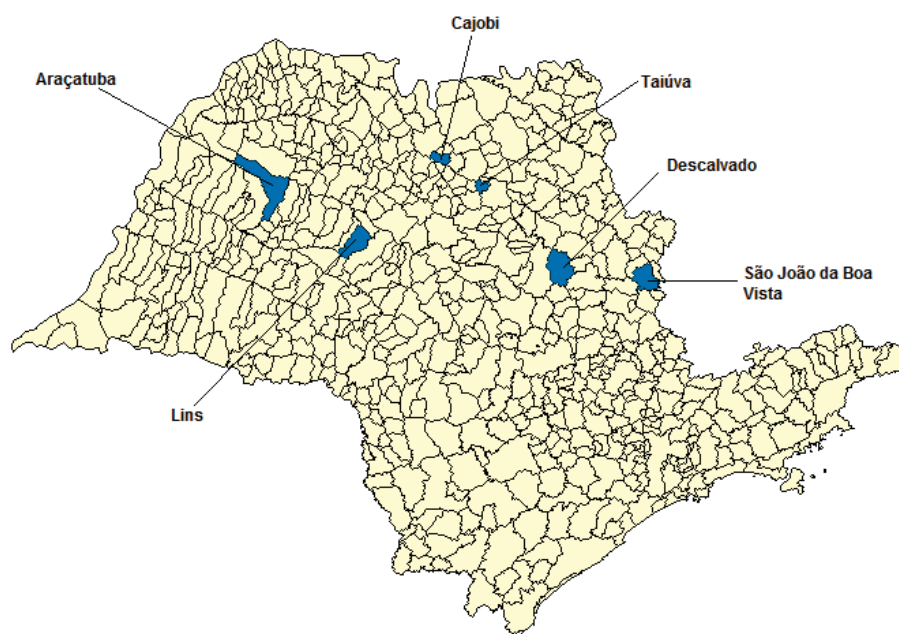


Figura 5. Municípios no Estado de São Paulo onde estavam localizados os rebanhos analisados para a presença de rotavírus, no período de março de 2010 a agosto de 2011.



Figura 6. Bezerreiro localizado no Estado de Goiás onde foram colhidas amostras fecais para análise da presença de rotavírus.



Figura 7. Amostra fecal sendo colhida diretamente da ampola retal de bezerro para análise da presença de rotavírus.

Tabela 1. Número total de animais separados pelo tipo de exploração do rebanho, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil.

Categoria	Nº Rebanhos	Nº Total de animais
Leite	53	707
Corte	3	58
Total	56	765

Tabela 2. Municípios, número de rebanhos e número total de animais de onde foram colhidas amostras fecais nos Estados de Minas Gerais e Goiás para análise da presença de rotavírus.

Municípios	Nº Rebanhos	Nº Total de animais
Minas Gerais		
Uberlândia	1	2
Belo Horizonte	1	3
Bom Jesus da Penha	1	10
Carmo do Rio Claro	3	30
Carmo do Cajuru	9	95
Casa Grande	1	6
Conselheiro Lafaiete	5	39
Cristiano Ottoni	1	14
Itaverava	2	9
Itaúna	3	14
Mateus Leme	1	12
Pará de Minas	2	60
Perdizes	2	46
Queluzito	1	5
Subtotal	33	345
Goiás		
Goiatuba	1	8
Jataí	10	111
Itarumã	1	7
Rio verde	1	15
Serranópolis	1	30
Bom Jesus de Goiás	1	58
Subtotal	15	229
TOTAL	48	574

Tabela 3. Municípios, número de rebanhos e número total de animais de onde foram colhidas amostras fecais nos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo para análise da presença de rotavírus.

Municípios	Nº Rebanhos	Nº Total de animais
Mato Grosso do Sul		
Campo Grande	1	47
Subtotal	1	47
São Paulo		
Araçatuba	1	44
Cajobi	1	5
Descalvado	2	69
Lins	1	10
Taiúva	1	10
São João da Boa Vista	1	6
Subtotal	7	144
TOTAL	8	191

3.2 Amostra padrão de rotavírus

Para as amostras de campo, foi utilizado como parâmetro de comparação a estirpe padrão NCDV (“Nebraska Calf Diarrhea Vírus”) de rotavírus bovino, cedida pelo Prof. Dr. José Antônio Jerez do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal- VPS, da Universidade de São Paulo/SP.

A amostra padrão foi inoculada em cultura de células da linhagem de macaco Rhesus - MA-104, adquirida junto ao Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro – BC/UFRJ.

Inicialmente, culturas de células da linhagem MA-104 foram preparadas utilizando-se frascos para cultura descartáveis, de poliestireno, com 25cm², da marca TPP-Suíça. O meio D-MEM (Mínimo Essencial MédiuM – Dulbecco), com 10% de soro fetal bovino, foi utilizado para o cultivo das células, seguindo-se as recomendações de TSUNEMITSU et al. (1991).

As culturas apresentando monocamadas confluentes foram tripsinizadas e colocadas em estufa a 37°C, e o acompanhamento foi realizado através de microscópio invertido.

Antes da inoculação, as garrafas foram lavadas três vezes com PBS (solução tampão fosfato)- pH 7,2 e o inóculo transferido para a monocamada. A adsorção foi realizada por 60 minutos a 37°C, homogeneizando suavemente a cada 15 minutos.

As culturas de células inoculadas com rotavírus foram acompanhadas diariamente para observação do efeito citopático. A comprovação do isolamento foi realizada pela técnica de EGPA.

3.3 Análise da presença de rotavírus por meio da técnica da EGPA

A pesquisa de rotavírus nas amostras de material fecal foi realizada segundo HERRING et al. (1982), com algumas modificações introduzidas por PEREIRA et al. (1985), utilizando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida.

3.3.1 Preparo da suspensão fecal

Suspensões de fezes a 20% foram preparadas em tampão Tris/cálcio (Tris/HCl 0,1M); CaCl_2 1,5 mM- pH-7,3). Depois foram homogeneizadas com agitações periódicas durante 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 3000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos “eppendorf” e a suspensão foi utilizada para a extração do RNA viral ou estocada a -20°C para posterior análise.

3.3.2 Extração do RNA viral para a EGPA

A extração do ácido nucléico viral consistiu em adicionar 40 μL de solução aquosa de Lauril Sulfato de Sódio (SDS) a 10% em 400 μL de suspensão fecal (anteriormente preparada), incubando-se a mistura a 37°C por 30 minutos. A seguir, adicionaram-se 200 μL de fenol e 200 μL de clorofórmio, incubando-se à temperatura

ambiente por 15 minutos, agitando-os a cada 5 minutos. Após a centrifugação a 2000 g por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para tubos tipo “eppendorf” contendo 40 μ L de solução aquosa de NaCl a 20% e adicionado 1 mL de etanol 75% (gelado) e os tubos foram incubados à -20°C (“overnight”). Após este período, centrifugou-se as suspensões por 30 minutos a 4300 g e o sobrenadante foi desprezado, e o material precipitado foi submetido a secagem, em temperatura ambiente, deixando os tubos em posição invertida sobre o papel de filtro. Posteriormente, aos pellets formados no fundo dos tubos foram adicionados 15 μ L de dissociador da amostra (3% SDS; 12,5% Tris/HCl 0,5M-pH 6,8; 5% de 2-mercaptoetanol; 0,005% azul de bromofenol; 40% glicerol), incubando-se por 30 minutos a 37°C. Decorrido esta última etapa, a amostra estava pronta para ser distribuída no gel de poliacrilamida.

3.3.3 Preparo do gel de poliacrilamida

Utilizou-se a solução estoque de acrilamida/bisacrilamida na concentração 30/0,8 para o preparo do gel de poliacrilamida.

O gel de poliacrilamida foi distribuído entre duas placas de vidro com espaçadores de 1,0mm de espessura e vedadas com ágar noble a 2%. Adicionou-se primeiramente o gel inferior (acrilamida 7,5% - bisacrilamida 0,2%; TEMED (tetrametiletilenediamina) 0,2%; persulfato de amônio 0,03%). Após a polimerização o gel superior foi adicionado (acrilamida 3,5% - bisacrilamida 0,04%, TEMED 0,2%, persulfato de amônio 0,015%), e o pente colocado imediatamente na abertura superior, para a formação das canaletas. Após o posicionamento do gel na cuba de corrida, os reservatórios desta foram preenchidos com tampão de corrida Tris/Glicina (Tris 0,025M, Glicina 0,109M-pH 8,3) e posteriormente as amostras com dissociador foram distribuídas nas canaletas. A corrida foi realizada a 20mA por placa, durante 2 horas e 30 minutos.

3.3.4 Coloração do gel com nitrato de prata

O processo de coloração com nitrato de prata foi realizado de acordo com HERRING et al. (1982), logo após o término da corrida. Ao ser retirado da cuba, o gel foi lavado três vezes com água destilada e fixado durante 30 minutos em solução aquosa de etanol (10%) e ácido acético (1%), sob agitação. A seguir, realizou-se a coloração com solução aquosa de nitrato de prata 0,011M, durante 60 minutos também sob agitação. Após esse período, a solução foi desprezada e lavou-se o gel para a retirada do excesso adicionando a solução reveladora de hidróxido de sódio 0,75M e formaldeído 0,95%, até ser possível visualizar os segmentos do genoma viral.

O bloqueio do processo de coloração foi realizado com solução de ácido acético 5% por 15 minutos, sob agitação, e o gel conservado em solução de etanol a 10%.

As amostras que apresentaram disposição de bandas na migração eletroforética semelhante à amostra padrão NCDV, foram consideradas positivas, sendo posteriormente submetidas à genotipagem.

3.4 Genotipagem das amostras positivas

A reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida de transcrição-reversa (RT) do RNA viral foi utilizada para a caracterização dos genótipos G e P de rotavírus bovino, baseando-se na metodologia descrita por GOUVEA et al. (1990, 1994a, 1994b).

O comprimento (número de pares de base) do segmento genômico produzido e amplificado na PCR, foi utilizado para a classificação das amostras positivas, comparando-as aos padrões de vírus cultivados em células MA. 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.

3.4.1 Extração do RNA dupla fita (dsRNA) de rotavírus bovino

O RNA de rotavírus bovino foi extraído a partir de suspensão fecal a 50% preparada em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) posteriormente clarificadas por centrifugação a 4.300 g por 15 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada.

Em 250µL da suspensão fecal obtidas anteriormente foram adicionados 750µL de TRIZOL¹, homogeneizados e após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200µL de clorofórmio. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 4.300 g por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante transferido a um novo tubo tipo “Eppendorf” e o RNA viral precipitado com 500µL de álcool isopropílico e incubado durante 15 minutos a -20°C. A seguir, a amostra foi centrifugada a 4.300 g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Ao material precipitado foi adicionado 950µL de etanol 75% e, novamente centrifugado nas mesmas condições, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após secagem em banho-maria seco a 56°C, o sedimento foi ressuspensão em 17µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A amostra foi incubada a 56 °C por 10 minutos e conservada a -20°C até o momento do uso.

3.4.2. Síntese do cDNA e reação em cadeia da polimerase

Para a síntese do cDNA foi utilizado o kit SuperScriptTM One-Step RT-PCR with Platinum® Taq², processando-se em uma única etapa a síntese do cDNA e a PCR dos genes que codificam para a proteína VP7 (gene 9) ou para a proteína VP4 (gene 4). A PCR foi processada em termociclador “Mastercycle” da marca “Eppendorf”.

Assim, 5µL 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 12,5µL do tampão de reação (2x Reaction mix – 0,4mM de dNTPs; 2,4mM MgSO₄), 0,5µL da enzima RT/Platinum Taq (Transcriptase Reversa) e 1,25µL dos “primers”

¹ TRIZOL Reagent® (Gibco BRL)

² Invitrogen – Life technologies

senso e anti-senso específicos para cada um dos genótipos G ou P, conforme descrito na Tabela 4, (“primers” Beg9, End9, End9CRW8, End9UK e “primers” con3 e con2, respectivamente), na concentração final de $10\text{pmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ cada. O volume da reação foi completado para $25\mu\text{L}$ com água tratada com DPEC (dietilpirocarbonato).

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 .

3.4.3. Multiplex “semi-nested” PCR

A segunda amplificação (multiplex “semi-nested” PCR) foi utilizada para a classificação das estirpes de rotavírus e consistiu em adicionar $0,5\mu\text{L}$ de DNA (ácido desoxirribonucléico) amplificado na etapa anterior à solução composta por $2,5\mu\text{L}$ de 10x PCR buffer II; $0,75\mu\text{L}$ de MgCl_2 -50mM; $0,5\mu\text{L}$ de DNTPs-10mM; $0,625\mu\text{L}$ na concentração de $20\text{pmol}/\mu\text{L}$ de “primer” mix G ou P (SBeg9, DT6, ET10, HT8, FT5, BT11 ou Con2, PB223, PGOOT, PNCDV, POSU, PUK, respectivamente, conforme dados da (Tabela 4) e $0,13\mu\text{L}$ da enzima Taq polimerase (50U).

O volume da reação foi completado para $25\mu\text{L}$ com água 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, $8\mu\text{L}$ dos produtos oriundos da 2ª 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 0,002M, pH 8,0), fazendo-se corar o gel em banho de água com $0,5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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.

Na (Tabela 4), são apresentadas as sequências de cada “primer” (iniciador), a posição no genoma, as estirpes a partir das quais as sequências foram referenciadas e o comprimento do segmento gênico esperado.

Tabela 4. Sequência dos iniciadores, localização no genoma dos rotavírus, comprimento do segmento amplificado e estirpes a partir das quais as sequências foram referenciadas.

Sorotipo/ Genotipo	Primer	Sequência (5' → 3')	pb*	Posição	Estirpe
P	Con2**	<i>ATTCGGACCATTATAACC</i>		868-887	KU
	Con3**	<i>TGGCTTCGCTCATTTATAGACA</i>	876	11-32	KU
	pNCDV	<i>CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG</i>	622	269-289	NCDV
	pUK	<i>GCCAGGTGTCGCATCAGAG</i>	555	336-354	UK
	pB223	<i>GGAACGTATTCTAATCCGGTG</i>	314	574-594	B223
	pGott	<i>GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG</i>	423	465-487	Gott
	pOSU	<i>CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC</i>	502	389-412	OSU
G	Beg9**	<i>GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG</i>		1-28	Wa
	sBeg9	<i>GGCTTTAAAAGAGAGAATTTTC</i>		1-21	Wa
	End9**	<i>GGTCACATCATAAATTCTAATCTAAG</i>	1062	1062-1036	UK
	DT6	<i>CTAGTTCCTGTGTAGAATC</i>	500	499-481	UK
	HT8	<i>CGGTTCCGGATTAGACAC</i>	274	273-256	B37
	ET10	<i>TTCAGCCGTTGCGACTTC</i>	715	714-697	B223
	FT5	<i>CATGTACTIONGTTGTTACGTC</i>	780	779-760	OSU
	BT11	<i>GTCATCAGCAATCTGAGTTGC</i>	337	336-316	YM

* Comprimento do segmento amplificado (pares de base)

** Primers usados para amplificar sequência completa

3.5 Análise estatística

A possibilidade de associação entre a presença de rotavírus, idade dos animais e consistência das fezes foi avaliada pelo teste de qui-quadrado (X^2), de acordo com THRUSFIELD (1995).

4. RESULTADOS

4.1 Triagens das amostras de fezes de bezerros pela EGPA

A triagem das amostras de fezes de bezerros para a detecção de animais positivos para rotavírus foi realizada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e os resultados encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros de rebanhos bovinos leiteiros e de corte separados pelo Estado de procedência e tipo de exploração da propriedade no período de março de 2010 a agosto de 2011.

Procedência	Tipo de exploração	Rebanho positivo/Total	%	Amostras analisadas +*/Total	%
São Paulo	Leite	3/7	42,8	6/144	4,1
	Corte	0/0	0	0/0	0
Subtotal		3/7	42,8	6/144	4,1
Mato Grosso do Sul	Leite	0/0	0	0/0	0
	Corte	0/1	0	0/47	0
Subtotal		0/1	0	0/47	0
Goiás	Leite	4/14	28,5	9/221	4,0
	Corte	0/1	0	0/8	0
Subtotal		4/15	26,6	9/229	3,9
Minas Gerais	Leite	2/32	6,2	5/342	1,4
	Corte	1/1	100	3/3	100
Subtotal		3/33	9,0	8/345	2,3
Total		10/56	17,8	23/765	3,0

+* = positivo

Nos 56 rebanhos amostrados distribuídos nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais, a taxa de ocorrência de rotavírus foi de 4,1%, 0%, 3,9% e 2,3%, respectivamente. Os resultados da EGPA mostraram que das 765

amostras de fezes colhidas de animais que manifestavam ou não quadro clínico de diarreia e com idade entre um e 60 dias, 23 amostras positivaram para rotavírus, representando taxa de ocorrência de 3,0% na população amostrada.

Na Tabela 6, os resultados das amostras de fezes de bezerros submetidas à análise pela EGPA para a detecção de rotavírus bovino, segundo o tipo de exploração da propriedade, mostraram que dos 53 rebanhos leiteiros, 9 (16,9%) apresentaram animais eliminando rotavírus, enquanto 33,3% (1/3) de positividade foi detectada em propriedades com exploração de corte.

Tabela 6. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, separados pelo tipo de exploração do rebanho, nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais.

Categoria	Rebanho Positivo/Total	%	Amostras Positivas/Total	%
Leite	9/53	16,9	20/707	2,8
Corte	1/3	33,3	3/58	5,1
Total	10/56	17,8	23/765	3,0

No Estado de Minas Gerais, das 28 amostras de fezes colhidas de animais com sinais clínicos de diarreia, 14,2% (4/28) apresentaram resultados positivos para rotavírus na EGPA, nos municípios de Belo Horizonte e Conselheiro Lafaiete. Enquanto que 1,2% (4/317) das amostras de fezes provenientes de animais com fezes não-diarreicas foram positivas para o rotavírus, nos municípios de Conselheiro Lafaiete e Carmo do Cajuru (Tabela 7).

No Estado de Goiás, a taxa de ocorrência do rotavírus entre os animais com diarreia foi de 13,7% (7/51) e 1,1% (2/178) entre os bezerros que não apresentavam diarreia. Nos municípios de Itarumã, Goiatuba e Rio Verde nenhuma amostra positiva foi detectada (Tabela 7).

Os resultados, quando submetidos à análise estatística pelo teste qui-quadrado mostraram uma relação significativa entre a ocorrência de rotavírus e a manifestação

clínica de diarreia nos municípios do Estado de Minas Gerais ($X^2 = 19,2$; $p < 0,01$) e Goiás ($X^2 = 16,6$; $p < 0,01$).

Tabela 7. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros de rebanhos de leite e de corte, segundo a consistência das fezes em rebanhos de municípios dos Estados de Minas Gerais e Goiás no período de março de 2010 a agosto de 2011.

Estado/Município	Rebanhos		Animais com diarreia			Animais sem diarreia		
	Nº	*+	Amostras+*	Total	%	Amostras+*	Total	%
Minas Gerais								
Uberlândia	1	0	0	1	0	0	1	0
Belo Horizonte	1	1	3	3	100	0	0	0
Bom Jesus da Penha	1	0	0	0	0	0	10	0
Carmo do Rio Claro	3	0	0	3	0	0	27	0
Carmo do Cajuru	9	1	0	7	0	3	88	3,4
Casa Grande	1	0	0	0	0	0	6	0
Conselheiro Lafaiete	5	1	1	5	20	1	34	2,9
Cristiano Ottoni	1	0	0	0	0	0	14	0
Itaverava	2	0	0	0	0	0	9	0
Itaúna	3	0	0	1	0	0	13	0
Mateus Leme	1	0	0	0	0	0	12	0
Pará de Minas	2	0	0	6	0	0	54	0
Perdizes	2	0	0	2	0	0	44	0
Queluzito	1	0	0	0	0	0	5	0
Subtotal	33	3	4	28	14,2	4	317	1,2
Goiás								
Goiatuba	1	0	0	2	0	0	6	0
Jataí	10	2	3	31	9,6	0	81	0
Itarumã	1	0	0	2	0	0	5	0
Rio verde	1	0	0	4	0	0	11	0
Serranópolis	1	1	2	7	28,5	1	23	4,3
Bom Jesus de Goiás	1	1	2	5	40,0	1	52	1,9
Subtotal	15	4	7	51	13,7	2	178	1,1
TOTAL	48	7	11	79	13,9	6	495	1,2

+* = positivo

No Estado do Mato Grosso do Sul (Tabela 8), apenas o município de Campo Grande foi analisado e nenhuma das amostras de fezes colhidas, tanto diarreicas como não-diarreicas foram positivas para rotavírus pela EGPA.

No Estado de São Paulo (Tabela 8), os animais apresentando diarreia tiveram taxa de 5,7% (5/87) de positividade para o rotavírus enquanto que nos animais considerados não-diarreicos a taxa de ocorrência foi de 1,7% (1/57).

Os resultados, quando submetidos à análise estatística pelo teste qui-quadrado ($X^2 = 1,37$ e; $p < 0,01$), mostraram uma relação significativa entre a ocorrência de rotavírus e a manifestação clínica de diarreia nos municípios do Estado de São Paulo.

Tabela 8. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros de rebanhos de leite e de corte, segundo a consistência das fezes em rebanhos de municípios dos Estados do Mato Grosso do Sul e São Paulo no período de março de 2010 a agosto de 2011.

Estado/Município	Rebanhos		Animais com diarreia			Animais sem diarreia		
	Nº	*+	Amostras+*	Total	%	Amostras+*	Total	%
Mato Grosso do Sul								
Campo Grande	1	0	0	5	0	0	42	0
Subtotal	1	0	0	5	0	0	42	0
São Paulo								
Araçatuba	1	1	1	8	12,5	0	36	0
Cajobi	1	1	1	5	20	0	0	0
Descalvado	2	1	3	48	6,2	1	21	0
Lins	1	0	0	10	0	0	0	0
Taiúva	1	0	0	10	0	0	0	0
São João da Boa Vista	1	0	0	6	0	0	0	0
Subtotal	7	3	5	87	5,7	1	57	1,7
TOTAL	8	3	5	92	5,4	1	99	1,0

+* = positivo

A maior ocorrência de amostras positivas foi observada em animais com idades entre 1 e 15 dias (Tabela 9) com percentual de 5,1% (10/195). Na faixa etária entre 16 e 30 dias, 3,3% das amostras foram positivas para rotavírus, enquanto a frequência de positividade entre os animais com idades de 31 a 45 foi de 1,4% (5/350) e de 46 a 60 dias foi de 4,0% (4/100).

Os dados foram submetidos à análise estatística pelo teste de Qui quadrado e os valores obtidos mostraram que as faixas etárias de um a 15 e 16 a 30 dias apresentaram maior frequência quando comparadas com as demais ($X^2 = 3,7$; $p < 0,01$).

Tabela 9. Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção de rotavírus, de acordo com a faixa etária dos animais em bezerros de rebanhos leiteiros e de corte de municípios nos Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais no período de março de 2010 a agosto de 2011.

Faixa etária (Dias)	Animais diarreicos		Animais sem diarreia		Total	%
	Amostra +* /Total	%	Amostra +* /Total	%		
1 a 15	6/75	8,0	4/120	3,3	10/195	5,1
16 a 30	3/42	7,1	1/78	1,2	4/120	3,3
31 a 45	4/25	16,0	1/325	0,5	5/350	1,4
46 a 60	3/29	10,3	1/71	1,4	4/100	4,0
Total	16/171	9,3	7/594	1,1	23/765	3,0

+* = positivo

4.2 Análise do perfil eletroforético do genoma de rotavírus pela EGPA

Neste estudo, de acordo com as características de migração eletroforética do genoma viral, foi possível agrupar os perfis encontrados em quatro eletroferotipos distintos denominados ao acaso A, B, C e D. Dentre as 23 amostras positivas para rotavírus, 11 pertenciam ao eletroferotipo A, três ao eletroferotipo B, 1 ao eletroferotipo C e duas ao eletroferotipo D, todos característicos de rotavírus do grupo antigênico A, sendo que 6 amostras não foram classificadas por apresentarem segmentos muito claros dificultando a comparação.

Tabela 10. Tipos eletroforéticos de rotavírus distribuídos segundo os municípios de origem em bezerros de rebanhos de corte e leite dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás.

Município	Amostra *	Perfis eletroforéticos				Amostras não classificadas
		A	B	C	D	
Belo Horizonte (MG)	03	02				01
Carmo do Cajuru (MG)	03	02				01
Conselheiro Lafaiete (MG)	02	02				
Jataí (GO)	03	02		01		
Bom Jesus (GO)	03	01	01			01
Serranópolis (GO)	03	02				01
Araçatuba (SP)	01		01			
Cajobi (SP)	01		01			
Descalvado (SP)	04				02	02
Total	23	11	03	01	02	06

* = positivo

4.3 Classificação das amostras de rotavírus pela Multiplex “semi-nested” RT-PCR

Na Tabela 11 são apresentados os resultados da identificação dos genótipos G e P de rotavírus bovino do grupo A através da reação de multiplex “semi nested” RT-PCR. A caracterização completa das 23 amostras de fezes com rotavírus de ambos os genótipos G e P só foi possível em 56% das amostras. O gene VP7 não foi caracterizado em 5 (21%) das amostras, enquanto que o gene VP4 foi caracterizado em 18 (78%) das amostras. Considerando o gene VP4, foram identificados quatro genótipos P diferentes (P[1], P[5], P[6] e P[11]). O mais frequente foi o tipo P[11],

detectado em 14 (60%) das amostras, seguidos de P[5] em 3 (13%), P[1] em 2 (8%) e P[6] que ocorreu em 1 (4%) das amostras. Os genótipos VP7 observados foram G6, G8, G10 e G11. O tipo G6 foi o mais frequente e foi identificado em 6 (26%) das amostras, seguidos por G8 (17%), G10 (8%) e G11(4%).

Tabela 11. Distribuição dos genótipos G e P de 23 amostras do grupo A de rotavírus, caracterizados pela reação de multiplex “semi nested” RT- PCR a partir de material fecal de bezerros dos Estados de Goiás, São Paulo e Minas Gerais no período de março de 2010 a agosto de 2011.

Origem da amostra	Identificação	Genótipo
Belo Horizonte-(MG)	BO/R*-01/10	G8P[5]
Belo Horizonte-(MG)	BO/R-02/10	G[-]P[-]
Belo Horizonte-(MG)	BO/R-03/10	G[-]P[-]
Carmo do Cajuru- (MG)	BO/R-610/10	G6P[11]
Carmo do Cajuru- (MG)	BO/R-617/10	G[-]P[-]
Carmo do Cajuru- (MG)	BO/R-618/10	G6P[11]
Conselheiro Lafaiete- (MG)	BO/R-834/10	G10P[11]
Conselheiro Lafaiete- (MG)	BO/R-837/10	G11P[11]
Cajobi- (SP)	BO/R-473/10	G10P[11]
Descalvado-(SP)	BO/R-215/10	G[-]P[6]
Descalvado-(SP)	BO/R-222/10	G6P[11]
Descalvado-(SP)	BO/R-227/10	G[-]P[-]
Descalvado-(SP)	BO/R-234/10	G6P[11]
Araçatuba-(SP)	BO/R-439/10	G[-]P[5]P[11]
Jataí- (GO)	BO/R-911/10	G[-]P[-]
Jataí- (GO)	BO/R-782/10	G6P[5]P[11]
Jataí- (GO)	BO/R-784/10	G6P[11]
Serranópolis- (GO)	BO/R-972/10	G8P[11]
Serranópolis- (GO)	BO/R-962/10	G8P[11]
Serranópolis- (GO)	BO/R-963/10	G[-]P[1]
Bom Jesus de Goiás- (GO)	BO/R-998/10	G8P[11]
Bom Jesus de Goiás- (GO)	BO/R-1032/10	G[-]P[1]
Bom Jesus de Goiás- (GO)	BO/R-1050/10	G[-]P[11]

* BO/R – nomenclatura padrão para estirpes de rotavírus infectando bovinos (ESTES & COHEN, 1989)

Infecções conjuntas de genótipos P[5]+P[11] e G6P[5]+P[11] ambas em uma amostra também foram observadas. Conforme apresentado na Figura 8, isoladamente, as associações de genótipos circulantes em rebanhos do Estado de Minas Gerais foram G6P[11], G8P[5], G11P[11] e G10P[11]. Em rebanhos dos Estados de São Paulo e Goiás, os genótipos circulantes foram G6P[11], G10P[11], G[-]P[5]+[11], G[-]P[6] (Figura 9) e G6P[5]+[11], G8P[11], G6P[11], G[-]P[1], G[-]P[11], (Figura 10), respectivamente.



Figura 8. Genótipos circulantes em rebanhos nos municípios onde foram detectadas amostras fecais positivas para rotavírus no Estado de Minas Gerais.

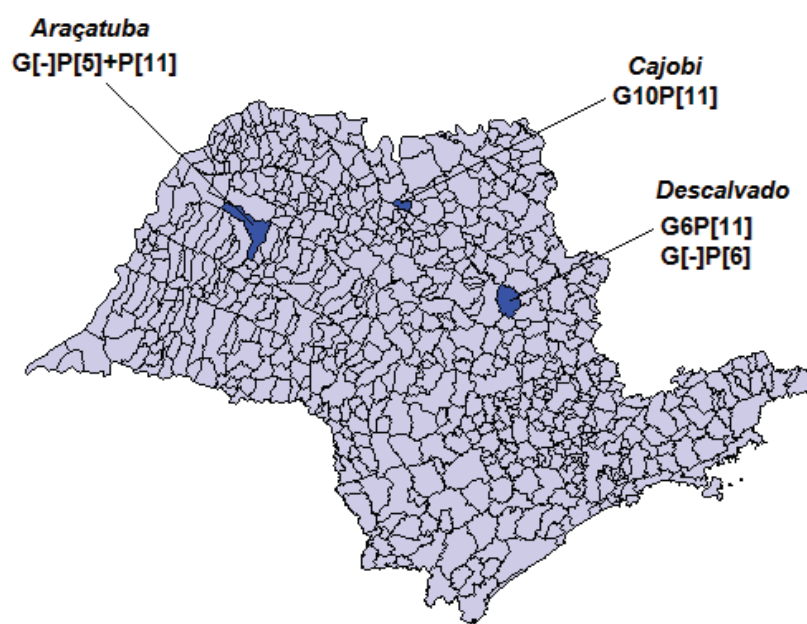


Figura 9. Genotipos circulantes em rebanhos nos municípios onde foram detectadas amostras fecais positivas para rotavírus no Estado de São Paulo.

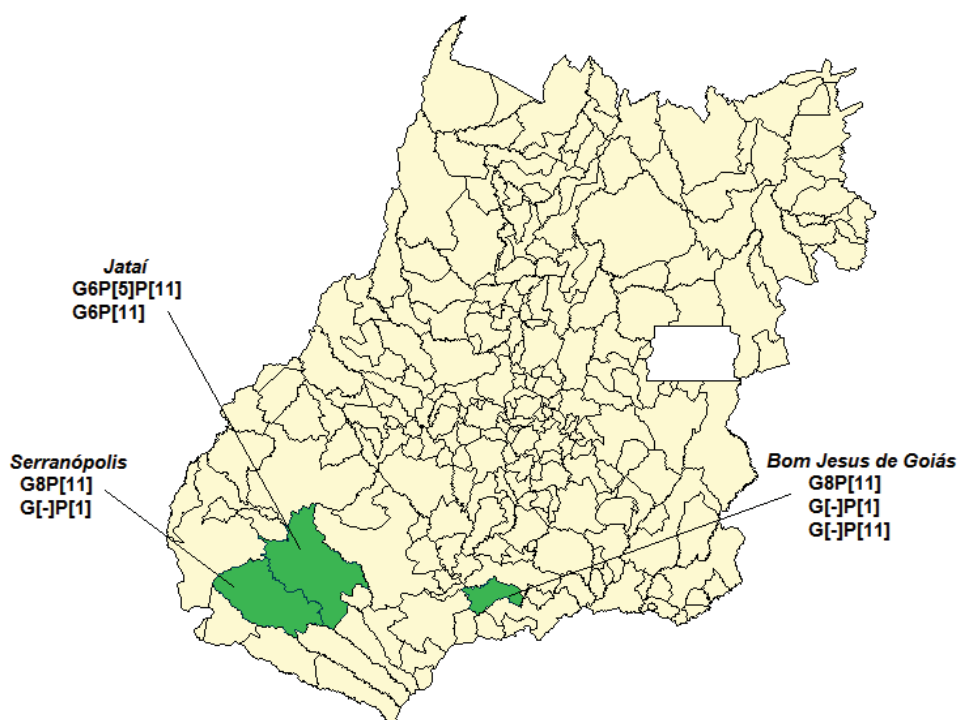


Figura 10. Genotipos circulantes em rebanhos nos municípios onde foram detectadas amostras fecais positivas para rotavírus no Estado de Goiás.

Na Figura 11 estão representados os segmentos amplificados da genotipagem G e P das amostras BO/R³ 834, BO/R 473 e controles positivo (amostra NCDV) e controle negativo (água tratada com DEPC). A partir da amostra BO/R- 834/10 e BO/R- 473/10 foi amplificado um segmento de 715 pares de base (pb), característicos do genotipo G10 e um segmento de 314 pares de base (pb), característicos do genotipo P11. Da amostra NCDV foi amplificado um segmento de 500 pares de base (pb), característico do genotipo G6 e um segmento de 622 pares de base (pb), característico do genotipo P1, demonstrando a amostra padrão de rotavírus NCDV- G6P[1].

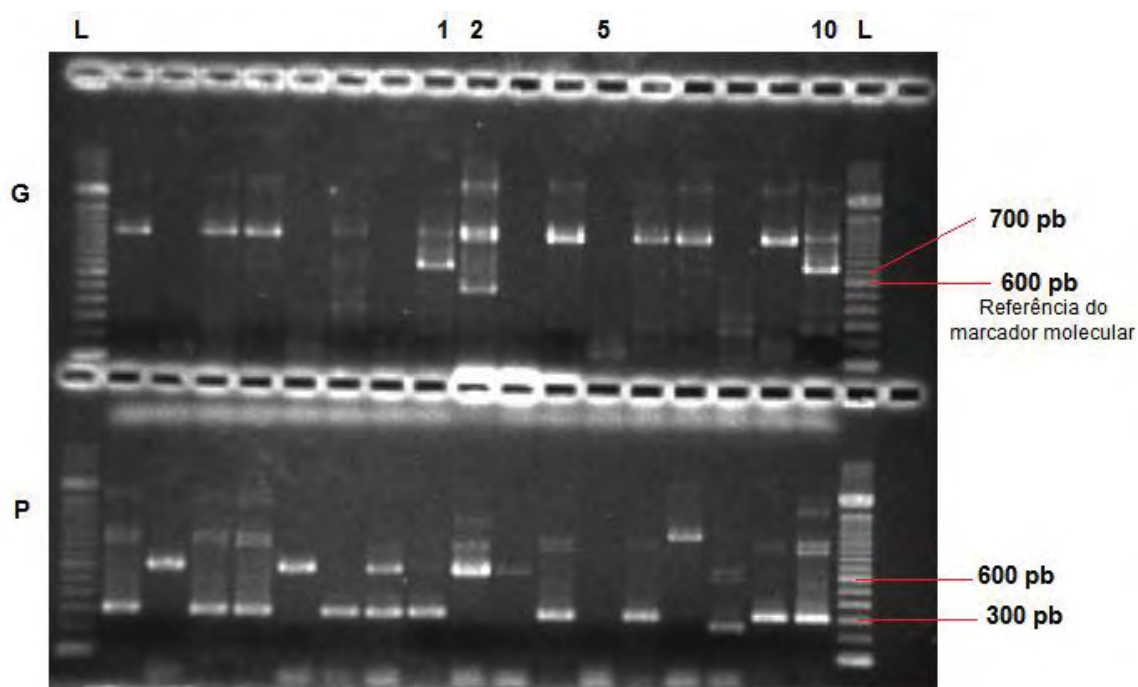


Figura 11. Fotografia em gel de agarose 1,2% mostrando o resultado da genotipagem das amostras BO/R³ 834 (1); NCDV-controle positivo (2); Controle negativo (5); BO/R 473 (10); para o genotipo G e P; L- marcador de peso molecular.

³ BO/R – nomenclatura padrão para estirpes de rotavírus infectando bovinos (ESTES & COHEN, 1989)

5. DISCUSSÃO

As doenças entéricas constituem um dos principais problemas de sanidade que afetam os rebanhos bovinos, resultando em grandes perdas econômicas em virtude da morbidade e mortalidade. Entre os vários agentes envolvidos nessa síndrome, o gênero *Rotavirus* assume importância em função da sua ocorrência, diversidade genética e implicação de ordem econômica e de saúde pública.

Considerando a importância clínica e a precocidade da infecção por rotavírus, os estudos sobre a variabilidade antigênica passaram a assumir grande interesse no monitoramento epidemiológico das estirpes circulantes e no controle da infecção por rotavírus.

A maioria dos estudos de frequência de rotavírus do grupo A em bezerros de rebanhos brasileiros são realizados em regiões geográficas específicas e relativamente com um número pequeno de amostras (JEREZ et al., 1987; BRITO, 1994; BUZINARO et al., 2000, 2003; ALFIERI et al., 2004).

Entre os rebanhos bovinos amostrados foi determinado um percentual de ocorrência de rotavírus de 17,8% (Tabela 5), o que mostra intensa circulação do vírus nos rebanhos em diferentes estados do Brasil. Comparando com os dados de prevalência disponíveis, encontra-se uma grande variação de valores, sendo que prevalências elevadas de 63,8% (SNODGRASS et al. 1986) a 78% (BUZINARO et al. 2003) foram são relatadas. Nesses estudos pregressos, a pesquisa da infecção por rotavírus foi realizada em rebanhos durante surtos de diarreia, com a maior parte das amostras de fezes analisadas proveniente de bezerros diarreicos, o que pode explicar a variação de resultados encontrados.

Em um estudo realizado onde não existia surtos, ALFIERI et al. (2006) relataram taxa de prevalência de 19,4% de rotavírus bovino do grupo A nas fezes diarreicas de bezerros em diversas regiões brasileiras, resultado semelhante ao encontrado nesta pesquisa.

A proporção de 9,3% (16/171) de amostras positivas para rotavirus pertencente ao grupo A encontrada em bezerros com fezes diarreicas demonstra a participação do

vírus na diarreia neonatal em rebanhos leiteiros e de corte nas regiões estudadas (Tabelas 6 e 9), confirmando a importância do rotavírus como agente etiológico nas doenças entéricas de bezerros no Brasil e em vários outros países (DE LA FUENTE et al., 1998; FUKAI et al., 1999; CONSTANTINI et al., 2002).

Nesta pesquisa não foi detectado rotavírus nas fezes de bezerros no rebanho analisado no Estado do Mato Grosso do Sul. Provavelmente, a análise das fezes de apenas um rebanho em um único município do Estado não foi suficiente para a detecção de possíveis resultados positivos, já que a presença do agente foi descrita por ALFIERI et al. (2004) e BARREIROS et al. (2004) em rebanhos bovinos do Estado do Mato Grosso do Sul.

Dentre as amostras de fezes não diarreicas, 1,1% (7/594) foram positivas para o rotavírus. Esse resultado é ressaltado por REYNOLDS et al. (1986) e ALFIERI et al. (2006) que detectaram casos positivos para rotavírus em bezerros clinicamente normais, sugerindo a presença de animais infectados de forma subclínica no rebanho caracterizando prováveis fontes de infecção para outros animais.

A frequência de ocorrência do rotavírus em fezes diarreicas foi maior, e estatisticamente significativa ($p < 0,01$), em bezerros de rebanhos de corte (Tabela 6). Segundo ALFIERI et al. (2006), este resultado pode ser consequência das diferentes práticas de manejo a que os bezerros estão sujeitos em rebanhos leiteiros e de corte. Nos rebanhos de corte, a prática do manejo reprodutivo nas temporadas de acasalamento com duração de 90 a 120 dias, resulta em uma concentração de nascimentos em um período relativamente curto, o que poderia facilitar a transmissão do enteropatógeno.

O rotavírus do grupo A é o principal agente etiológico de diarreia em animais jovens, especialmente em grupos na faixa etária em que a imunidade passiva está em declínio (CONNER et al., 1994). O aspecto imunológico associado com a grande resistência do rotavírus nas condições ambientais e o grande número de partículas virais (10^{10}) eliminadas durante o período agudo da enfermidade (ESTES, 2001), favorece a infecção dos animais no período neonatal. Neste estudo, as faixas etárias de um a 15 e 16 a 31 dias apresentaram maior frequência de ocorrência de rotavírus

quando comparadas com as demais faixas de idade ($p < 0,01$). Estes resultados indicam que os cuidados no manejo da saúde do animal e programas profiláticos para rotavírus bovino devem ter como objetivo animais nesta faixa etária (BARREIROS et al., 2004).

O perfil de migração do dsRNA, visualizado após a técnica de EGPA, define o eletroferotipo, também chamado padrão genômico, utilizado para caracterizar as estirpes de rotavírus (ESTES & COHEN, 1989). Assim, foi observada uma grande diversidade genômica das amostras positivas para rotavírus durante o período da pesquisa (Tabela 10).

Trabalhos realizados por outros autores, em rebanhos bovinos leiteiros também detectaram grande variação de perfil eletroforético entre as amostras estudadas (THEIL & McCLOSKEY, 1989; MENDES et al. 1993). Resultados semelhantes foram obtidos no Brasil por JEREZ et al. (1989) que identificaram quatro perfis eletroforéticos de 27 amostras positivas estudadas, e FERREIRA (2006) que caracterizou o perfil eletroforético de 15 amostras de rotavírus bovino encontrando mudanças de comportamento na migração eletroforética dos segmentos genômicos do RNA viral. No entanto, outros autores têm evidenciado ausência de diversidade genômica em amostras de campo quando estudadas por determinados períodos de tempo (ISHIZAKI et al., 1995).

A análise de eletroferótipos representa uma importante metodologia no estudo epidemiológico dos rotavírus. Diferenças no padrão de migração podem estar relacionadas a alterações na sequência de nucleotídeos, tais como as resultantes de reagrupamentos genéticos (WATANABLE et al., 2001).

Atualmente, técnicas de biologia molecular como a reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa, (RT-PCR) para a detecção do genoma viral tem facilitado o diagnóstico da rotavirose, contribuindo com a real estimativa da prevalência das infecções, bem como, com a definição dos genótipos de rotavírus circulantes em uma população ou rebanho, sua distribuição geográfica e sazonal (DESSELBERGER et al., 2001). Paralelamente, a RT-PCR tem demonstrado ser uma técnica eficaz na identificação de estirpes virais com genótipos incomuns e também de infecções mistas, com estirpes de rotavírus pertencentes a diferentes genótipos (HEIDE

et al., 2005), influenciando no estabelecimento de mecanismos de profilaxia mais efetivos.

As vacinas inativadas contra rotavírus disponíveis contêm estirpes prevalentes das regiões onde são produzidas (EUA e Argentina), como NCDV-Lincoln (G6P[1]), UK (G6P[5]) e B223 (G10P[11]). A resposta imune dos animais resultante dessa vacinação é mais direcionada para a estirpe vacinal, facilitando a ocorrência de infecções provocadas pelas estirpes circulantes na região e diferentes da vacinal (CONNER et al., 1994).

Assim, apesar da vacinação materna, o rotavírus continua a ser detectado nas fezes de bezerros com diarreia (BARREIROS et al., 2004), o que tem estimulado o surgimento de variantes antigênicas, aumento de infecções mistas em decorrência da formação de recombinantes, dando origem a novas estirpes virais (LU et al., 1994; DENNEHY., 2008). Tal fato aumenta a importância do conhecimento dos genótipos prevalentes nas regiões para uma resposta vacinal mais efetiva.

Apesar dos genótipos G[6], G[8], G[10] e P[1], P[5] e P[11] serem predominantemente encontrados em bovinos, descritos nesta espécie tanto no Brasil (BRITO et al., 2000; ALFIERI et al., 2004) quanto em outros países (FALCONE et al., 1999; EL-ATTAR et al., 2002; GARAI COECHEA et al., 2006), há relatos na literatura de infecções em bezerros por rotavírus do grupo A pertencentes a outros genótipos G e P.

No presente estudo, em relação ao Estado de Goiás, observou-se a ocorrência do genótipo G8 com mais frequência em 33,3% (3/9) das amostras seguido do tipo G6 em 22,2% (2/9). E considerando o gene VP4, foi detectado os genótipos P[11] em 66,6% (6/9), P[1] em 22,2% (2/9), P[5] em 11,1% (1/9) e associação de P[5]+[11] em 11,1% (1/9) das amostras, caracterizando a presença de infecções mistas. A combinação genotípica mais frequente foi G8P[11], presente em 33,3% (3/9) das amostras fecais. Estes achados corroboram os resultados de CARUZO et al. (2010), que apesar de identificarem o genótipo G6 como o mais frequente (64,5%), os tipos P[1] foram encontrados em 9,7%, P[11] em 32,2% e associações de P[5]+P[11] em um

estudo de 31 amostras positivas para rotavírus no Estado de Goiás, apesar de não ter sido caracterizado nenhum genotipo G6P[5].

De acordo com ITURRIZA-GÓMARA et al. (2001), estas combinações podem ser resultado de coinfeções ou reestruturações genéticas caracterizadas por mecanismos de evolução os quais envolvem mutações pontuais (“drifts”); reestruturações (“shifts, reassortants”) ou troca de segmentos de RNA entre amostras; e rearranjos (“rearrangements”), que consistem em duplicações e deleções de sequência nucleotídica dentro de um segmento genômico (TANIGUCHI & URASAWA, 1995), reforçando a idéia de que segmentos exibindo genes VP4 e VP7 podem segregar independentemente de maneira natural.

O genotipo G6 foi o de maior ocorrência em 33,33% (2/6) das amostras fecais obtidas em rebanhos no Estado de São Paulo, seguido de G10 em 16,66% (1/6). O tipo [P11] ocorreu em 66,66% (4/6) seguido de duas amostras caracterizadas como P[5] e P[6]. A combinação mais frequente foi G6P[11] em 33,33%. Estes achados concordam com os de BUZINARO et al. (2009), que por sua vez, caracterizaram molecularmente rotavírus bovino do grupo A no Estado de São Paulo durante os anos de 2003 e 2004, detectando a predominância do genotipo G6 em 61,1%, além da ocorrência dos genotipos P[5], P[11] e combinações de P[5]+P[11].

Considerando outras pesquisas, estirpes com os genotipos G6 e G10 já foram anteriormente observadas em rebanhos brasileiros por BRITO (2000), que identificou o genotipo G6 como sendo mais frequente em rebanhos bovinos do Estado de Goiás e por ALFIERI et al. (2004) que detectaram o genotipo G6 e G8 como os mais frequentes em rebanhos de bovinos de exploração de corte e leite em três Estados brasileiros. No Japão e Índia, FUKAI et al. (2002) e SARAVANAN et al. (2006) , também detectaram os genotipos G6, G8 e G10 como os mais frequentes em bovinos.

Com relação ao gene VP4, os resultados encontrados no presente estudo podem ser considerados muito peculiares quando comparados com os tipos P mais frequentemente relatados, P[11] e P[5]. Assim, 60,8% das amostras foram caracterizadas como P[11] e 13,0% como P[5], dentre outros. Resultados não coincidentes foram encontrados por ALFIERI et al. (2004) em rebanhos dos Estados do

Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, verificando a predominância do genótipo P[5] em 66% das amostras analisadas. Assim como na Itália, em rebanhos de exploração de corte e leite, FALCONE et al. (1999) detectaram os genótipos P[1], P[5] e P[11], com predominância do genótipo P[5].

Além dos relatos anteriormente citados quanto à caracterização destes genótipos em bovinos, corroboram os achados de MONINI et al. (2008), que apesar de não ter detectado P[1] no conjunto das amostras, relatou 65,1% de P[11], 25% de P[5] e somente 2,5% de combinações do tipo P em rebanhos na Itália. E no Brasil, BARREIROS et al. (2004) também detectaram os genótipos P[11] e P[5] em rebanhos dos Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná.

Conhecer as combinações de genótipos existentes nos rebanhos é importante, pois oferece informações para uma possível imunização artificial ativa dos animais.

As combinações mais comuns dos genes VP7/VP4 em bovinos são G6P[5] (UK-like), G6P[1] (NCDV-like) e G10P[11] (HUSSEIN et al., 1993; FUKAI et al., 1999; GHOSH et al., 2008). Nesse sentido, GARAIKOECHEA et al. (2006) caracterizaram 60% de rotavírus bovino do grupo A como G6P[5] em rebanhos na Argentina. Por sua vez, ALFIERI et al. (2004) também relataram a combinação G6P[5] como a mais prevalente em 40% das amostras coletadas em rebanhos das regiões Sul, Sudeste e Central do Brasil seguidos de 12% como G6P[1] e 16% de G10P[11]. No entanto, estas frequências foram muito mais altas quando comparadas com os resultados do presente estudo onde não foi caracterizado nenhum genótipo G6P[1] e G6P[5], apesar de ter sido encontrado a associação de G6P[5]P[11] em 4,3% das amostras. Os tipos G8P[11] foram caracterizados em 13,0% e G10P[11] em 8,6%, apesar do menor número de amostras genotipadas.

Na Irlanda, REIDY et al. (2006), caracterizaram somente 1,9% de suas 54 amostras como G6P[1] e 1,9% como G10P[11], e GARAIKOECHEA et al. (2006) não encontraram a combinação G6P[1] e somente 4,4% de G10P[11].

O genótipo G6P[11] foi o mais prevalente representando 21,7% das amostras, que é consistente com CARUZO et al. (2010), que caracterizou 16,2% como G6P[11]. REIDY et al. (2006) e GARAIKOECHEA et al. (2006) também descreveram este

genotipo em seus estudos, mas em baixas frequências (7,4% e 4,4%, respectivamente).

Observou-se também a ocorrência de 4,3% de combinações G6P[5]+P[11] e P[5]+P[11], sugerindo a existência de infecções mistas, mas em baixas frequências quando comparados com estudos de REIDY et al. (2006) e SWIATEK et al. (2009) que também descreveram combinações mistas G6P[5]+P[11] em algumas amostras (11% e 15,4%, respectivamente). Dessa forma, a presença de mais de um tipo de gene VP7 ou VP4 encontrado nas amostras sugerindo infecções mistas em um hospedeiro, facilita a ocorrência de troca de um ou mais segmentos durante a replicação do vírus, resultando em uma nova e diversa população de rotavírus (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2001).

No Estado de Minas Gerais foram detectadas as combinações G6P[11] em 25% (2/8) das amostras, G10P[11] em 12,5% (1/8), G8P[5] em 12,5% (1/8) e G11P[11] em 12,5% (1/8). A estirpe de rotavírus G11 foi primeiramente isolada de suínos em várias regiões do México em 1983 (RUIZ et al., 1988) e subsequentemente identificada nos Estados Unidos da América (EUA) e na Venezuela (CIARLET et al., 1994; ROSEN et al., 1994).

O estudo de HUSSEIN et al. (1993), confirmaram a existência do genotipo G11 em amostras de rotavírus bovino entre outros incomuns nos Estados Unidos. A participação do genotipo G11, considerado tipicamente suíno e encontrado em humanos por vários autores (BÁNYAI et al., 2009; RAHMAN et al., 2005; SHIM et al., 2011), nos achados deste trabalho, constitui-se como um grande significado epidemiológico devido aos raros relatos desse genotipo em bovinos no Brasil e as possíveis indicações de compartilhamento de amostras entre bovinos e suínos. Entretanto, GREGORI et al. (2009) também observaram a presença de genotipos predominantemente bovinos ao caracterizar molecularmente amostras fecais de suínos no Estado de São Paulo, sugerindo uma potencial infecção cruzada do vírus.

Os genotipos G e P não foram definidos em 5 (21,7%) das amostras por meio das reações de semi-nested RT-PCR. O gene VP7 não foi caracterizado em 5 (21%) das amostras, enquanto que o gene VP4 caracterizado em 18 (78%) das amostras. A não caracterização de amostras de rotavírus em seus genotipos é um fato relatado por

vários autores, entre eles, FUKAI et al. (2002) que identificaram os genótipos G em 76% e P em 68,3% das amostras bovinas submetidas a PCR, e ALFIERI (1999) que por sua vez, obteve definição de genótipos em 96% das amostras também submetidas a técnica de PCR.

Dentre as causas que podem levar a uma indefinição de genótipos mediante a RT-PCR, pode ser aventado o fato do RNA ser extraído diretamente de amostras fecais, podendo ocorrer uma coprecipitação de substâncias inibidoras inespecíficas presentes nas fezes que atuam nos primeiros passos da amplificação da PCR, inibindo a desnaturação e o anelamento dos iniciadores conforme salientado por GOUVEA et al. (1990); o armazenamento das amostras por um longo período, o que pode levar a uma diminuição do título viral (RÅDSTRÖM et al., 2002; SHAY FOUT et al., 2003); o vírus em questão pertencer a um genótipo diferente daqueles contemplados pelos primers utilizados nas reações (WINIARCZYK & GRADZKI, 1999); ou até mesmo a presença de rotavírus do grupo não-A circulantes nas regiões estudadas.

As análises moleculares deste estudo demonstraram que as amostras de rotavírus circulantes em rebanhos dos Estados de São Paulo, Goiás e Minas Gerais apresentam, na sua maioria, genótipos concordantes com aqueles descritos na literatura, tanto no Brasil quanto em outros países. Entretanto, detectou-se a ocorrência de um genótipo tipicamente suíno, o que pode sugerir uma infecção cruzada, tornando necessário um maior detalhamento deste achado, em especial agregando-se dados epidemiológicos e de sequenciamento genético dos genes codificadores da VP4 e VP7, como de outras regiões do genoma. Pesquisas contínuas visando o monitoramento dos genótipos presentes nas criações são essenciais para o aprimoramento de medidas profiláticas específicas.

6. CONCLUSÕES

A avaliação dos resultados obtidos permitiu as seguintes conclusões:

1. a ocorrência do rotavírus nas regiões pesquisadas indica a participação do agente na etiologia da diarreia neonatal dos bezerros naqueles animais que apresentaram sinais clínicos e sugere a presença de portadores nos rebanhos e prováveis fontes de infecções para outros animais;
2. a maior frequência de rotavírus foi encontrada na faixa etária de 1 a 15 dias (5,1%), existindo correlação entre a presença de rotavírus e a idade dos animais;
3. a análise do perfil eletroforético das estirpes de rotavírus identificou quatro eletroferotipos distintos (A, B, C e D), com grande diversidade genômica nos rebanhos estudados;
4. a caracterização genotípica das amostras por meio da técnica de RT-PCR indicou a ocorrência de infecções singulares por rotavírus, observando-se as associações dos genotipos G6P[11], G8P[5], G11P[11], G10P[11], G[-]P[5]+P[11], G[-]P[6], G6P[5]+P[11], G8P[11], G8P[-], G[-]P[1], G[-]P[11].

7. REFERÊNCIAS *

- ABE, M.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; TAKASU, M.; MURASE, T.; KAWASHIMA, T.; KAWAI, J.K.; SUGIYAMA, M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Res.**, v.144, p.250-257, 2009.
- ABE, M.; ITO, N.; MATASANI, T.; NAKAGAWA, K.; YAMAOKA, S.; KANAMARU, Y.; SUZUKI, H.; SHIBANO, K.; ARASHI, Y.; SUGIYAMA, M. Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P [29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. **J. Gen. Virol.**, London, v. 92, p. 952-960, 2011.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z.I.P. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 3. ed. Santa Maria: ufsm, 2007. p. 773-807.
- ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A.A; BARREIROS, M.A.B.; LEITE, J.P.G.; RICHTZENHAIN, L.J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 99, p. 167-173, 2004.
- ALFIERI, A. et al. RT-PCR for genotyping group A bovine rotavirus. **Virus Rev. Res.**, v.3, p. 57, 1998.
- ALFIERI, A. F. **Caracterização dos genótipos G e P de rotavírus grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela reação da polimerase em cadeia**. 1999.134f. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo, 1999.
- ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v. 38, p. 521-526, 2006.
- ALTENBURG, B. C.; GRAHAM, D. Y.; ESTES, M. K. Ultrastructural study of rotavirus replication in cultured cells. **J.Gen. Virol.**, London, v.46, p.75-85, 1980.

* ABNT-NR 6023

BÁNYAI, K.; ESONA, M.D.; KERIN, T.K.; HULL, J.J.; MIJATOVIC, S.; VÁSCONEZ, N.; TORRES, C.; FILIPPIS, A.M.B.; GENTSCH, J.R. Genetic diversity and zoonotic potential of human rotavirus strains, 2003–2006. **J. Med. Virol.**, New York, v. 81, p. 362-370, 2009.

BARREIROS, M. A.B. et al. G and P genotypes from group A rotavirus detected in vaccinated cattle against NCDV rotavirus strain. **Virus Rev. Res.**, v.5, p.176, 2000.

BARREIROS, M. A.B.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.A. G e P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV P[1] G6 rotavirus strain. **J. Vet. Med.**, Germany, n. 51, p.104-109, 2004.

BEARDS, G.M.; BEARDS, G. M.; CAMPBELL, A.D.; COTTRELL, N.R.; PEIRIS, J.S.; REES, N.; SANDERS, R.C.; SHIRLEY, J.A.; WOOD, H.C.; FLEWETT, T.H. Enzyme-Linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 19, n. 2, p. 248-254, 1984.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. **Lancet.**, London, v. 2, p. 1281-1283, 1973.

BLUTT, S.E.; KIRKWOOD, C.D.; PARRENO, V. Rotavirus antigenaemia and viraemia: a common event? **Lancet.**, London, v. 362, 1445–1449, 2003.

BRANDÃO, P.E.; CORTEZ, A.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M.B.; RICHTZENHAIN, L.J.; ROSALES, C.A.R.; JEREZ, J.A. Ocorrência de anticorpos anti-rotavírus em bovinos no estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.3, p.115-116, 2002a.

BRANDÃO, P.J.; CORTEZ, A.; FERREIRA, F.; NETO, J.S.F.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M.B.; HOMEM, V.S.F.; RODRIGUEZ, C.A. R.; JEREZ, J.A. Seroprevalence of antibodies against group A rotavirus in cattle from a pioneer frontier in Brazilian Amazon. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.39, n.1, p.18-29, 2002b.

BRIDGER, J. C.; WOODE, G. N. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. **Br. Vet. J.**, London, v. 31, p. 528-535, 1975.

BRITO, W. M. E. D. Bovine rotavirus in the State of Goiás. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.25, n.4, p.229-234, 1994.

BRITO, W. M. E. D.; MUNFORD, V.; VILLAÇA, A.M.; CARUZO, T.A.R. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v.31, n.2, 2000.

BROWNING, G.F.; FITZGERALD, A.; CHALMERS, R.M.; SNODGRASS, R. A novel group A rotavirus G serotype: serological and genomic characterization of equine isolate FI23. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.29, p.2043-5, 1991.

BUZINARO M.G.; MUNFORD, V.; BRITO, V.M.E.D, RÁCZ, M.L.; JEREZ, J.A. Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 6, p. 555-561, 2000.

BUZINARO, M. G.; FREITAS, P. P. S. Rotavírus do grupo A em rebanhos bovinos leiteiros da região Nordeste do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.4, p.23-26, 2002.

BUZINARO, M.G.; MISTIERI, M.L.A.; CARVALHO, A.A.B.; SAMARA, S.I.; REGITANO, L.C.A.; JEREZ, J.A. Prevalência de rotavírus do grupo A em ezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 3, p. 266-270, 2003.

BUZINARO, M.G.; MUNFORD, V.; BRITO, V.M.E.D.; RÁCZ, M.L.; JEREZ, J.A. Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 52, n. 6, p. 555-561, 2009.

CANDEIAS, J. A. N.; ROSENBERG, C. P.; RÁCZ, M. L. Identificação por contraímunoelctroforese de rotavirus em casos de diarréia infantil. **Rev. Saúde Pública.**, São Paulo, v. 12, p. 99-103, 1978.

- CARUZO, T.A.R.; BRITO, W.M.E.D.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M.L. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v.105, n.8, p. 1040-1043, 2010.
- CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; CILLI, V.; GUALANDI, G.L. ALDROVANDI, V. Neonatal calf diarrhea induced by rotavirus. **Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.**, Oxford, v. 11, n.2, 71-84, 1988.
- CHAUHAN, R.S.; SINGH, N.P. Epidemiology of rotavirus infection in calves in India. **Int. J. Anim.Sci**, v. 11, 221–223, 1996.
- CHINSANGARAM, J.; SCHORE, C.E.; GUTERBOCK, W.; WEAVER, L.D.; OSBURN, B.I. Prevalence of group A and group B rotaviruses in the feces of neonatal dairy calves from California. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 18, p. 93-103, 1995.
- CIARLET, M.; HIDALGO, M.; GORZIGLIA, J.M.; LIPRANDI, F. Characterization of neutralization epitopes on the VP7 surface protein of serotype G11 porcine rotaviruses. **J. Gen .Virol.**, London, v. 75, p.1867-1873, 1994.
- CIARLET, M.; CONNER, M.E. ; FINEGOLD, M.J. ; ESTES, M.K. Group A rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. **J. Virol.**, Washington, v. 76, p. 41–57, 2002.
- CIARLET, M.; PINA, C.I.; GARCIA, O.; LIPRANDI, F. Identification of bovine rotaviruses in Venezuela: antigenic and molecular characterization of a bovine rotavirus strain. **Res. Virol.**, Amsterdam, v. 148, p. 289-297, 1997.
- COLLINS, P.J.; MARTELLA. V. ; BUONAVOGLIA, C. ; O´SHEA, H. Identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4 type, P[32]. **Vet. Res.**, Paris, v.41, n.5, 2010.
- CONNER, M. E.; MATSON, D. O.; ESTES, M. K. Rotavirus vaccines and vaccination potential. In: RAMIG, R. F. **Current Topics in Microbiology and Immunology (Rotaviruses)**, 1994, v.185, p.285-337.
- COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K.; GOMARA, M.I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **J. Infect.**, London, v. 48, p. 289-302, 2004.

- COSTATINI, V.; PARREÑO, V.; BARRANDEGUY, M.; COMBESSIES, G.; BARDÓN, J.; ODEÓN, A.; LEUNDA, M.; SAIF, L.; FERNANDEZ, F. Group A bovine rotavirus: diagnosis and antigenic characterization of strains circulating in the Argentine Republic, 1994-1999. **Rev. Argent. Microbiol.**, Buenos Aires, v.34, n.2, p.110-116, 2002.
- CRAWFORD, S.E.; PATEL, D.G.; CHENG, E.; BERKOVA, Z. HYSER, J.M.; CIARLET, M.; FINEGOLD, M.J.; CONNER, M.E.; ESTES, M.K. Rotavirus viremia and extra intestinal viral infection in the neonatal rat model. **J. Virol.**, Washington, 80, p. 4820-4832, 2006.
- CUCKOR, G.; BERRY, M. K.; BLACKLOW, N. R. Simplified radioimmunoassay for detection of human rotavirus in stools. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 138, p. 906-910, 1978.
- DE LA FUENTE, R.; GARCIA, A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; LUZÓN, M.; CID, D.; GARCÍA, S.; ORDEN, J.A. & GÓMEZ-BAUTISTA, M. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. **Prev. Vet. Med.** v. 36, p. 145-152, 1998
- DE LEEUW, P.W.; ELLENS, D.J.; STRAVER, P.J.; BALKEN, J.A.M.; MEERMAN, A.; BAANVINGER, T. Rotavirus infections in calves in dairy herds. **Res.Vet.Sci.** v.29, p.135-141, 1980.
- DENNEHY, P.H. Rotavirus vaccines: An overview. **Clin. Microbiol.Rev.**, Washington, v. 21, n.1, p.198-208, 2008.
- DESSELBERGER, U.; ITURRIZA-GOMARA, M.; GRAY, J. Rotavirus epidemiology and surveillance. In: Novartis Foundation Symposium, 2001. Anais...[SI]: 2001, v. 238, p.125-127.
- DHAMA, K.; CHAUHAN, R.S.; MAHENDRAN, M.; MALIK, S.V.S. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Vet. Res. Commun.**, Dordrecht, v.33, p.1-23, 2009.
- DURIGON, E. L.; CANDEIAS, J.A.N.; JEREZ, J.A.; BITTENCOURT, M.J.; ORTOLANI, E.L. Comparison of Staphylococcal co-agglutination with other assay for rapid diagnosis of rotavirus infection in humans, calves and piglets. **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v. 35, p. 73- 79, 1991.

EL-ATTAR, L.; DHALIWAL, W.; GÓMARA-ITURRIZA, M.; BRIDGER, J.C. Identification and molecular characterization of a bovine G3 rotavirus which causes age-independent diarrhea in cattle. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, n.3, 2002.

ELLENS, D. J.; DELEEUW, P. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 6, n. 5, p. 530-532, 1977.

ESONA, M.D.; STEELE, D.; KERIN, T.; ARMAH, G.; PEENZE, I.; GEYER, A.; PAGE, N.; NYANGAO, J.; AGBAYAA, V.A.; TRABELSI, A.; TSION, B.; AMINU, M.; SEBUNYA, T.; DEWAR, J.; GLASS, R.; GENTSCH, J. Determination of the G and P types of previously nontypeable rotavirus strains from the African Rotavirus Network, 1996-2004: Identification of unusual G types. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 202, p.49-54, 2010.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M. et al. **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001, p.1747-1785.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.53, p.410-449, 1989.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M. et al. **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2007, p.1917-1974.

FALCONE, E.; TARANTINO, M.; TRANI, DI.; CORDIOLI, P.; LAVAZZA, A.; TOLLIS, M. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n.12, p. 3879-3882, 1999.

FENAUX, M.; CUADRAS, M.A.; FENG, N.; JAIMES, M.; GREENBERG, H.B.; FERREIRA, T.L. Extraintestinal spread and replication of a homologous EC rotavirus strain and a heterologous Rhesus rotavirus in BALB/c mice. **J. Virol.**, Washington, v. 80, p. 5219-5232, 2006.

FERREIRA, T.L. **Perfil eletroforético de rotavírus em amostras fecais diarréicas e após isolamento em culturas de células da linhagem MA-104**. 2006. 56f. Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo, 2006.

FIJTMAN, N.L.; BARRANDEGUY, E.M.; CORNAGLIA, E.M.; SCHUDEL, A.A. Variations and persistency of electrophoretotypes of bovine rotavirus field isolates. **Arch. Virol.**, Vienna, v.96, p.275-281, 1987.

FLORES, E.F. In: _____. **Virologia Veterinária**. 3. ed. Santa Maria: ufsm, 2007. p. 297-326.

FUKAI, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOU, T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. **Vet. Microbiol.** v.66, p. 301-311.

FUKAI, K.; MAEDA, Y.; FUJIMOTO, K.; ITOU, T.; SAKAI, T. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 86, n.4, p.343-349, 2002.

GARAICOECHEA, L.; BOK, K.; JONES, L.R.; COMBESSIES, A.; ODÉON, A.; FERNANDEZ, F.; PARREÑO, V. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10 year period (1994-2003). **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 118, p. 1-11, 2006.

GENTSCH, J. R.; WOODS, P.A.; RAMACHANDRAN, M.; DAS, B.K.; LEITE, J.P.; ALFIERI, A.; KUMAR, R.; BHAN, M.K.; GLASS, R.I. Review of G and P typing results from a global collection of strains: Implications for vaccine development. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.174, p.30-36, 1996.

GERNA, G.; SARASINI, A. ; ZENTILIN, L. ; DI MATTEO, A. ; MIRANDA, P. ; PAREA, M. ; MATTAGLIA, M. ; MILANESI, G. Isolation in Europe of 69-M-like (serotype 8) human rotavirus strains with either subgroup I or II specificity and a long RNA electrophoretotype. **Arch. Virol.**, Vienna, v.112, p.27-40, 1990.

GHOSH, S.; SAMADJAR, S.; SINHA, M.; KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, K.; NAIK, N.T. Molecular characterization of rare bovine group A rotavirus G15P[11] and G15P[21] strains from eastern India: identification of simian SA11-like VP6 genes in G15P[21] strains. **Virus Genes.**, Boston, v. 37, n.2, p. 241-249, 2008.

GLASS, R.I.; PARASHAR, U.D. The promise of new rotavirus vaccine. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 354, n.1, p. 75-77, 2006.

GONZALES, R. A.; ESPINOSA, R.; ROMERO, P.; LÓPEZ, S.; ARIAS, C.F. Relative localization of viroplasmic and endoplasmic reticulum-resident rotavirus proteins in infected cells. **Arch. Virol.**, Wien, v.145, n.9, p.1963-1973, 2000.

GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. Polimerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n.2, p.276-282, 1990.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n.5, p. 1338-1340, 1994a.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, n. 5, p.1333-1337, 1994b.

GREENBERG H.B.; ESTES, M.K. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. **Gastroenterology.**, Bethesda, v.136, n.6, p. 1939-1951, 2009.

GREGORI, F.; ROSALES, C.A.R.; BRANDÃO, P.E.; SOARES, R.M.; JEREZ, J.A. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 9, p. 707-712, 2009.

GREGORI, F.; BRANDÃO, P.E.; ROSALES, C.A.R.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M.B.; RICHTZENHAIN, L.J.; JEREZ, J.A. Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 191-194, 2000.

GREGORI, F. **Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criações de suínos, localizadas no Estado de São Paulo.** 2003. 139f. Tese de Doutorado em Epidemiologia experimental aplicada às zoonoses, Universidade de São Paulo, 2003.

GUMUSOVA, S.O.; YAZICI, Z.; ALBAYRAK, H.; MERAL, Y. Rotavirus and coronavirus prevalence in healthy calves and calves with diarrhea. **Medycyna Weterinaria**, Samsun, v. 63, n.1, p. 62-64, 2007.

HEIDE, R.V.; KOOPMANS, M.P.G.; SHEKARY, N.; HOUWERS, D.J.; VAN DUYNHOVEN, Y.T.H.P.; VAN DER POEL, W.H.M. Molecular characterization of human and animal group A rotaviruses in the Netherlands. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.2, n.43, p.669-675, 2005.

HERRING, A. J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, v. 16, n. 3, p. 473-7, 1982.

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

HUSSEIN, H.A.; PARWANI, A.V.; ROSEN, B.I.; LUCCHELLI, A.; SAIF, L.J. Detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3 and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction-derived cDNA probes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, p. 2491-2496, 1993.

IMAI, M.; AKATANI, K.; IKEGAMI, N.; FURUICHI, Y. Capped and conserved terminal structures in human rotavirus genome double-stranded RNA segments. **Journal of Virology**, Washington, v.47, n. 1, p.125-136, 1983.

ISHIZAKI, H.; OHTA, C.; SHIRAHATA, T.; GOTO, H.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S. Persistence of a single electropherotype and serotype (G6P5) of bovine rotavirus in calves on a closed dairy farm from 1990 to 1993. **Am. J. Vet. Res.**, Shaumburg, v.56, p.1019-1024, 1995.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; ISHERWOOD, B.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. **J. Virol.**, v. 75, n. 8. p. 3696-3705, 2001.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; KANG, G.; GRAY, J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. **J.Clin.Virol.**, Amsterdam, v.31, p.259-265, 2004.

IZZO, M.M.; KIRKLAND, P.D.; MOHLER, V.L.; PERKINS, N.R.; GUNNA, A.A.; HOUSE, J.K. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. **Aust. Vet. J.**, Victoria, v. 89, n. 5, 2011.

- JEREZ, J. A. Diarréias virais dos bezerros: rotavírus e coronavírus. **Biológico**, São Paulo, v. 59, n. 2, p. 33-37, 1997.
- JEREZ, J. A.; CANDEIAS, J.A.N.; DURIGON, E.L.; RÁCZ, M.L. Anticorpos anti-rotavírus em bovinos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.18, n.4, p. 371-374, 1987.
- JEREZ, J. A.; CANDEIAS, J.A.N.; RÁCZ, M.L.; DURIGON, E.L.R.; CONRADO, L. Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarréicas de bezerros. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.20, p. 257-7, 1989.
- KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N. et al. **Fields Virology**. 3. ed., New York: Raven Press, 1996. cap. 2, p.1657-1708.
- KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; CHAN-IT, W.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. **Virology**., New York, v. 361, n. 2, p. 243-252, 2007.
- KIM, H. J.; PARK, J.G.; MATTHIJNSSENS, J.; LEE, J.; BAE, Y.; ALFAJORO, M.M.; PARK, S.; KANG, M.; CHO, K. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. **Vet. Microbiol.**, (2011), doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.017
- KOHARA, J.; TSUNEMITSU, H. Correlation between maternal serum antibodies and protection against bovine rotavirus diarrhea in calves. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v.62, n.2, p.219-221, 2000.
- LANGONI, H.; LINHARES, A.C.; AVILA, F.A.; DA SILVA, A.V.; ELIAS, A.O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, p. 313-319, 2004.
- LU, W.; DUHAMEL, G.E.; DAVID A. BENFIELD, D.A.; GROTELUESCHEN, D.M. Serological and genotypic characterization of group A rotavirus reassortants from diarrheic calves born to dams vaccinated against rotavirus. **Vet Microbiol.**, Amsterdam, v. 42, p.159-170, 1994.
- LUGINBUHL, A.; REITT, K.; MEZLER, A.; KOLLBRUNNER, M.; CORBOZ, L.; DEPLAZES, P. Field study about prevalence and diagnostics of diarrhea causing agents

in the new-born calf in a Swiss veterinary practice area. **Schweiz. Arch. Tierheilkd.**, v. 147, p. 245-252, 2005.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of Rotavirus diarrhea. **Microbes Infect.**, Paris, v.3, p.1145-1156, 2001.

MARKOWSKA, D.I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSAK, Z. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. **Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.**, Amsterdam, v. 19, n.3, p.219-232, 1996.

MARTELLA, V.; PRATELLI, A. ; GRECO, G. ; TEMPESTA, M. ; FERRARI, M. ; LOSIO, M.N. ; BUONAVOGLIA, C. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, Washington, v. 8, n. 1, p. 129-132, 2001.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M.C. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 140, p. 246-255, 2010.

MATTHIJNSSENS, J.; DE GRAZIA, S.; PIESSENS, J.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; GIAMMANCO, G.M.; BÁNYAI, K.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M.; MARTELLA, V.; VAN RANST, M. Multiple reassortment and interspecies transmission events contribute to the diversity of feline, canine and feline/canine-like human group A rotavirus strains. **Infect. Genet. Evol.** 2011, doi:10.1016/j.meegid.2011.05.007

McNULTY, M. S., LOGAN, E. F. Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. **Vet. Rec.**, London, v.13, p.333-335, 1983.

MEBUS, C.; UNDERDAHL, N.R.; RHODES, M.B.; TWIEHAUS, M.J. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **Nebraska Researc. Bul.**, Lincoln, v.233, p.1-16, 1969.

MENDES, V.M.; DE BEER, M.C.; GOOSEN, G.H.; STEELE, A.D. Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in south african calves. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, n. 12, p. 3333-3335, 1993.

MONINI, M; CAPPUCINI, F.; BATTISTA, P.; FALCONE, E. ; LAVAZZA, A. ; RUGGERI, F.M. Molecular characterization of bovine rotavirus strains circulating in northern Italy, 2003-2005. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 129, p. 384-389, 2008.

- MONINI, M.; BIASIN, A.; VALENTINI, S.; CATTOLI, G.; F.M. RUGGERI, F.M. Recurrent rotavirus diarrhoea outbreaks in a stud farm, in Italy. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 149, p.248-253, 2011.
- MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. Reoviridae. In: MURPHY, F.A.; GIBBS, E.P.J.; HORZINEK, M.C.; STUDDERT, M.J. **Veterinary Virology**. 3. ed. USA: Academic Press, 1999. p 391-404.
- NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. **Microbiol. immunol.**, Tokyo, v.37, p.337-348, 1993.
- PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; ANDRADE, Z.P.; CASTRO, L.A. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v.10, p. 21-8, 1985.
- PISANELLI, G.; MARTELLA, V.; PAGNINI, U.; DEMARTINO, L.; LORUSSO, E.; IOVANE, G.; BUONAVOGLIA, C. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes in buffalo group A rotaviruses isolated in Southern Italy. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 110, p. 1-6, 2005.
- RADOSTITS, O. M. ; GAY, C.C. ; HINCHCLIFF, K.K.W. ; CONSTABLE, P.D. **Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**. 10.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007, 2156p.
- RÅDSTRÖM, P.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P.; DAHLENBORG, M.; LÖFSTRÖM, C. Pre-PCR processing of samples. In: PCR detection of microbial pathogens. In: **Methods in Molecular Biology**. Totowa: Humana Press Inc., 2002, v. 216, p. 31-50.
- RAHMAN, M.; DE LEENER, K.; GOEGEBUER, T.; WOLLANTS, E.; VAN DER DONCK, I.; VAN HOOVELS, L.; VAN RANST, M. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.41, p. 2088-2095, 2003.
- RAHMAN, M.; MATTHIJNSSENS, J.; NAHAR, S.; PODDER, G.; SACK, D.A.; AZIM, T.; RANST, M.V. Characterization of a novel P [25], G11 human group a rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 43, n .7, p. 3208-3212, 2005.

- RAMIG, R.F. et al. Genus rotavirus. In: FAUQUET, C.M.; MAYO, M.A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. 8.ed. Amsterdam: Elsevier, 2005, p. 484-496.
- RAMOS, A. P.D.; STEFANELLI, C.C.; LINHARESA, R.E.C.; BRITO, B.G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; LIMAB, R.C.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.71, p. 1-8, 2000.
- REIDY, N.; LENNON, G.; FANNING, S.; POWER, E.; O'SHEA, H. Molecular characterization and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002–2004. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 117, 242–247, 2006.
- REYNOLDS, D.J.; MORGAN, J.H. ; CHANTER, N. ; JONES, P.W. ; BRIDGER, J.C. ; DEBNEY, T.G.; BUNCH, K.J. Microbiology of calf diarrhoea in souther Britain. **Vet. Rec.**, London, v.12, n.119, p.34-9, 1986.
- ROSEN, B.I.; PARWANI, A.V.; LOPEZ, S.; FLORES, J.; SAIF, L.J. Serotypic differentiation of rotaviruses in field samples from diarrhetic pigs by using nucleic acid probes specific for porcine VP4 and human and porcine VP7 genes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 32, p. 311-317, 1994.
- RUIZ, A. M. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. **J. Virol.**, Washington, v. 62, n. 11, p. 4331-4336, 1988.
- SARAVANAN, M.; PARTHIBAN, M.; RAMADASS, P. Genotyping of rotavirus of neonatal calves by nested-multiplex PCR in India. **Veterinarski Arhiv.**, Zagreb, v. 76, n. 6, p. 497-505, 2006.
- SATO, M.; NAKAGOMI, T.; TAJIMA, K.; EZURA, K.; AKASHI, H.; NAKAGOMI, O. Isolation of serotypes G8, P6[1] bovine rotavirus from adult cattle with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, p.1266-1268, 1997.
- SCHLAFER, D.H.; SCOTT, F.W. Prevalence of neutralizing antibody to the calf rotavirus in NewYork cattle. **Cornell Vet.**, Ithaca, v. 69, 262–271, 1979.
- SCHWARZ, B. A.; BANGE, R.; VAHLENKAMP, T.W.; JOHNE, R.; MULLER, H. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcriptionpolymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v. 105, p. 277-285, 2002.

- SCOTT, P.R.; HALL, G.A.; JONES, P.W.; MORGAN, J.H. Calf Diarrhoea. In: ANDREWS, A.H.; BLOWEY, R.W.; BOYD, H.; EDDY, R.G. **Bovine Medicine – diseases and husbandry**. 2.ed. Oxford: Blackwell Science, 2004. cap.14, p.185-214.
- SHAY FOUT, G. SHAY FOUT, G.; MARTINSON, B.C.; MOYER, M.W.N. A multiplex reverse transcription- PCR method for detection of human enteric viruses in groundwater. **App. Envir. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3158-64, 2003.
- SHIM, J.O.; SHIM, J.O.; BAEK, I.H.; LE, V.P.; KO, E.; SEOK, W.; UH, Y.; KIM, J.K.; AHN, S.Y.; LEE, H.S.; EELL RYOO, E.; SO-YEON SHIM, S.; SONG, W.; LIM, I.; KIM, W. Molecular characterization of rotavirus diarrhea among children in South Korea: detection of an unusual G11 strain. **Arch. Virol.**, Wien, v.156, n. 5, p. 887-892, 2011.
- SNODGRASS, D.R.; TERZOLO, H.R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J.D.; SYNGE, B.A. Etiology of diarrhoea in young calves. **Vet. Rec.**, London, v.12, n.119, p.31-4, 1986.
- STEELE, A.D.; GEYER, A.; GERDES, G.H. Rotavirus infections. In: COETZER, J.A.W.; TUSTIN, R.C. **Infectious diseases of Livestock**. Oxford University Press, Southern Africa, 2004, p.1256–1264.
- STEYER, A.; PRIJATELJ-POLJSAK, M.; MAGANJA-BARLIC, D.; MARIN, J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: Evidence of interspecies transmission and genome reassortment. **J. Gen. Virol.**, London, v. 89, p.1690- 1698, 2008.
- SWIATEK, D.L.; PALOMBO, E.A.; LEE, A.; COVENTRY, M.J.; BRITZ, M.L.; KIRKWOOD, C.D. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 140, p. 56-62, 2009.
- TANIGUCHI, K.; WAKASUGI, F.; PONSUWANNA, Y.; URASAWA, T.; UKAE, S.; CHIBA, S.; URASAWA, S. Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. **Epidemiol. Infect.**, Cambridge, v. 109, n. 2, p. 303-312, 1992.
- TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. Diversity in rotavirus genomes. **Semin.Virol.**, London, v. 6, n.2, p.123-131, 1995.

- THEIL, K. W. McCLOSKEY, C.M. Molecular epidemiology and subgroup determination of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in dairy and beef calves. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.27, p.126-131, 1989.
- TRUSFIELDS, M. Veterinary epidemiology. Oxford: **Blackweel Science**, 1995.
- TSUNEMITSU. H.; YONEMICHI, H.; HIRAI, T.; KUDO, T.; ONOES, S.; MORI, K.; SHIMIZU, M. Isolation, characterization, and derail propagation of a bovine group C rotavirus in a monhey kidney cell line (MA104). **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 11, p. 2609-13, 1991.
- VENDE, P.; KAROUM, R.; MANET, G.; RIZET, C.; SCHELCHER, F.; COHEN, J.; NAVETAT, H. Molecular epidemiology or bovine rotaviruses from the Charolais area. **Vet. Res.**, Paris, v. 30, n. 5, p.451-456, 1999.
- WALTER, R. **Umweltvirologie**. Viena: Springer-Verlag Wien New York, 2001.
- WATANABLE, M.T.; NAKAGOMI, T. ; KOSHIMURA, Y. ; NAKAGOMI, O. Direct evidence for genome segment reassortment between concurrently circulating human rotavirus strains. **Arch. Virol.**, Wien, v. 146, p. 557-570, 2001.
- WHO. **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater**. 3. ed. Genebra: World Health Organization, 2006.
- WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z. Comparison of polymerase chain reaction and dot hybridization with enzyme-linked immunoassay, virological examination and polyacrylamide gel electrophoresis for the detection of porcine rotavirus in faecal specimens. **J. Vet. Med.**, Germany, v. 46, n. 9, p. 623-34, 1999.
- WOODE, G. N.; JONES, J.; BRIDGER, J. Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhea virus. **Vet. Rec.**, London, v.97, p.148-149, 1975.
- WOODE, G.N. Viral diarrhea in calves. **Vet. Annual.**, n. 16, 30–34, 1976.
- YAMAMOTO, D.; MITSUYO KAWAGUCHIYA, M.; GHOSH, S.; ICHIKAWA, M.; NUMAZAKI, K.; KOBAYASHI, N. Detection and full genomic analysis of G6P[9] human rotavirus in Japan. **Virus Genes.**, Boston, v. 37, p. 241-249, 2011.
- ZARATE, S.; ROMERO, P.; ESPINOSA, R.; ARIAS, C.F.; LÓPEZ, S. VP7 mediates the interaction of Rotaviruses with integrin $\alpha\beta 3$ through a novel integrin-binding site. **J.Virol.**, Washington, v.78, n.20, p.10839-10847, 2004.