

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

RESPOSTA IMUNE ATIVA E PASSIVA INDUZIDA POR
VACINA COMERCIAL CONTRA ROTAVIROSE BOVINA

Liliane Cristina Mazer

Médica Veterinária

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RESPOSTA IMUNE ATIVA E PASSIVA INDUZIDA POR
VACINA COMERCIAL CONTRA ROTAVIROSE BOVINA**

Liliane Cristina Mazer

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Glória Buzinaro

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

JABOTICABAL - SÃO PAULO – BRASIL

Novembro de 2012

M476r Mazer, Liliâne Cristina
Resposta imune ativa e passiva induzida por vacina comercial
contra rotavírose bovina / Liliâne Cristina Mazer. – – Jaboticabal, 2012
ix, 49 f. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012

Orientadora: Maria da Glória Buzinaro

Banca examinadora: Samir Issa Samara, Ricardo Luiz Moro de
Souza

Bibliografia

1. *Bovinos*. 2. Imunidade. 3. Rotavírus. 4. Vacina inativada I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

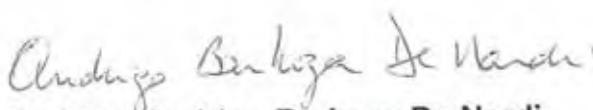
CDU 619:616.98:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: arnold@cnpso.embrapa.br

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

Certificamos que o Protocolo nº 016.846/12 do trabalho de pesquisa intitulado **"Avaliação da imunidade passiva contra rotavirose em bezerros descendentes de vacas vacinadas com vacina comercial"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria da Gloria Buzinaro está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 06 de agosto de 2012.

Jaboticabal, 09 de agosto de 2012.

A handwritten signature in black ink, reading 'Andriago Barboza De Nardi'.

Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LILIANE CRISTINA MAZER- nascida em 30 de junho de 1978, no município do Ribeirão Preto, ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia em agosto de 1996, concluindo-o em agosto de 2001. Durante o curso de graduação, foi responsável pelo programa extensão em clínica médica e cirúrgica de pequenos animais. Ingressou na área técnica e regulatória da empresa Ourofino Agronegócios Ltda., sendo responsável técnica substituta para produtos biológicos. Ingressou no programa de pós graduação em Medicina Veterinária no curso de mestrado em Medicina Veterinária Preventiva em agosto de 2010, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- UNESP- Campus Jaboticabal.

“Prepare-se para o pior, espere o melhor e
receba o que vier.”
(Autor desconhecido)

Dedico este trabalho à minha querida sobrinha Mariana cujo nascimento despertou em mim a vontade e a necessidade de ser uma pessoa melhor. Assim que ela nasceu, comecei a superar medos, vencer obstáculos até ter a confiança de que poderia fazer mestrado. Mariana, menina guerreira, sua vida é uma vitória que rezo para ser repleta de felicidades proporcionadas por todos que te cercam e te amam.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida.

Aos meus pais e familiares pelo amor que tenho recebido de vocês.

À profa. Dra. Maria da Gloria Buzinaro, pela oportunidade de realização deste meu sonho. Obrigada pela confiança em mim depositada.

À Dra. Daniela Gomes Silva, pela colaboração durante todo o desenvolvimento deste trabalho e ao Dr. Samir Issa Samara pelas sugestões.

Aos meus diretores Fausto Terra, pela confiança, incentivo pessoal e profissional nestes anos de convívio diário e Dr. Carlos Henrique pelo exemplo de pessoa de vanguarda a ser seguido, em seus nomes agradeço a empresa para qual trabalho, que me possibilitou esta oportunidade.

À Lya Sepulveda, amiga, mestre, exemplo que eu gostaria de seguir (a não ser pelos hábitos saudáveis!). Obrigada pelos ensinamentos no laboratório e na vida.

Aos amigos do laboratório principalmente Michelle Raymudo que me ajudou tanto e sem essa ajuda provavelmente não teria conseguido fazer os tão esperados ELISAS e Evanilda Silva pela ajuda na execução da eletroforese, Kelly Capeti, Adriano Zenchel, pela ajuda, ensinamentos, companheirismo nos momentos difíceis, afinal existem “ependorfes que racham”. Ao Dr. Celso e Miriam Ramos, Ricardo Assman, Flavia Camargo e Liliana Massis, por toda ajuda e orientação experimental, vocês são um ótimo time para aprender.

Aos veterinários Fabio Marson, Murilo Bichuette, Henry Newton, pela ajuda nas colheitas.

À Adriana Gonzalez e Mariana Fernandez, pelas opiniões das técnicas.

Ao Dr. Alexandre médico veterinário da fazenda e Osni e Celma tratadores dos animais, obrigada pela ajuda na execução das colheitas.

Ao prof. Gener Tadeu Pereira, pelo auxílio nas análises estatísticas.

A minha querida psicóloga Marilurdes, você me ajudou a “enxergar” e tornou possível uma mudança de atitude.

E ao Fábio Furlan, meu noivo, pelo carinho, pela paciência e pela falta dela neste período.

Enfim cada um que participou de alguma forma neste trabalho, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Característica dos vírus.....	2
2.2 Patogenia manifestação clínica e diagnóstico.....	5
2.3 Ocorrência de rotavírus em rebanhos bovinos brasileiros.....	7
2.4 Prevenção da rotavirose em bezerros.....	9
3. OBJETIVOS.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Manejo dos animais e colheita das amostras.....	16
4.2 Processamento das amostras.....	18
4.3 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA indireto) para detecção de anticorpos anti-rotavírus no soro sanguíneo e no colostro	18
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	21
4.5 Análise estatística.....	23

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Níveis séricos de anticorpos anti-rotavírus em vacas vacinadas e não vacinadas antes da vacinação (D-60), antes da revacinação (D-30) e no parto.....	24
5.2 Níveis colostrais de imunoglobulinas anti-rotavírus em vacas vacinadas e não vacinadas, antes da vacinação (D-60), da revacinação (D-30) e no dia do parto (D0).....	28
5.3 Níveis séricos de imunoglobulinas anti-rotavírus em bezerros em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas que mamaram seus respectivos colostros.....	31
5.4 Excreção de rotavírus em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas.....	39
6. CONCLUSÕES.....	41
7. REFERÊNCIAS.....	42

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Momentos de amostragem e tipos de amostras coletadas das vacas vacinadas e não vacinadas e seus respectivos bezerros.....	17
Tabela 2. Diluições utilizadas dos conjugados imunoenzimáticos na técnica de ELISA indireto.....	20
Tabela 3. Níveis séricos médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto, em vacas vacinadas e não vacinadas contra rotavírus, 60 e 30 dias antes do parto e no dia do parto.	24
Tabela 4. Níveis médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensuradas por ELISA indireto, no colostro de vacas vacinadas e não vacinadas, no dia do parto.....	28
Tabela 5. Níveis séricos médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto em bezerros, no dia do nascimento e 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o nascimento.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Esquema do genoma e proteínas codificadas pelo rotavírus.....	3
Figura 2: Bezerreiros da fazenda.....	17
Figura 3: Níveis séricos médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto, antes da vacinação (D-60), antes da revacinação (D-30) e no dia do parto em vacas vacinadas comparativamente com vacas não vacinadas (controle).....	25
Figura 4: Níveis médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensuradas por ELISA indireto, no colostro de vacas vacinadas e não vacinadas, no dia do parto.....	29
Figura 5: Níveis séricos médios (A/P) de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.....	32
Figura 6: Níveis séricos médios (A/P) de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas não vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.....	32
Figura 7: Níveis séricos médios (A/P) de IgG, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas, no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.....	33
Figura 8: Níveis séricos médios (A/P) de IgG1, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas, no dia do	

nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.....34

Figura 9: Níveis séricos médios (A/P) de IgG2, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.....35

Figura 10: Níveis séricos médios (A/P) de IgM, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.....36

Figura 11: Níveis séricos médios (A/P) de IgA, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.....37

LISTA DE ABREVIATURAS

RNA: ácido ribonucleico

dsRNS: RNA de dupla fita (“double strand ribonucleic acid”)

VP: proteína viral (“viral protein”)

NSP: proteína não estrutural (“non structural protein”)

mRNA: RNA mensageiro

ELISA: ensaio imunoenzimático (“enzyme linked immunoabsorbent assay”)

PCR: reação de cadeia da polimerase

qRT-PCR: reação quantitativa em tempo real de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase

IgM: imunoglobulina classe M

IgG: imunoglobulina classe G

IgG1: imunoglobulina classe G, subclasse 1

IgG2: imunoglobulina classe G, subclasse 2

IgA: imunoglobulina classe A

CLP: partículas como o core ou capsídeo interno (“core like particles”)

VLP: partículas como o vírus (“virus like particles”)

D-60: sessenta dias antes da data provável de parição, dia da vacinação

D-30: trinta dias antes da data provável de parição, dia da revacinação

D0: dia do parto

D1: um dia após o nascimento

D7: sete dias após o nascimento

D14: quatorze dias após o nascimento

D21: 21 dias após o nascimento

D28: 28 dias após o nascimento

PEG: polietilenoglicol

PBS: tampão fostato (“phosphate buffer”)

mL: mililitro

μL: microlitro

SDS: dodecil sulfato de sódio

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

DO: densidade óptica

PBSTOII: tampão PBS + tween+ ovoalbumina grau II

OPD : ortofenilenodiamino

HCl: ácido clorídrico

Tris: tampão tris(hidroximetil)aminometano

Ca⁺: cálcio

TEMED: tetrametiletilenodiamina

mA: miliampere

M: molar

ANOVA: análise de variância

SAS: sistema de análise estatística (“Statistical Analysis System”)

IM: intramuscular

IMm: intramamária

RESPOSTA IMUNE ATIVA E PASSIVA INDUZIDA POR VACINA COMERCIAL CONTRA ROTAVIROSE BOVINA

RESUMO- Este estudo teve como objetivo avaliar a imunidade ativa e passiva contra rotavirose bovina induzida por vacina comercial em vacas e seus respectivos bezerros, oriundos de propriedade no município de Cravinhos, Estado de São Paulo. Foram realizadas análises dos níveis séricos das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2, IgM e IgA anti-rotavírus das vacas antes da vacinação (aproximadamente 60 dias antes do parto), antes da revacinação (aproximadamente 30 dias antes do parto) e no momento do parto, pela técnica de ELISA indireto. Os níveis colostrais das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2 IgM e IgA no dia do parto foram avaliados pela mesma técnica. Os níveis de imunoglobulinas dos bezerros, nascidos das vacas vacinadas e não vacinadas alimentados com seus respectivos colostros, foram avaliados no dia do nascimento (D0) antes da mamada do colostro e 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o nascimento. A excreção de rotavírus nas fezes dos bezerros foi avaliada por SDS-PAGE. Neste estudo os níveis séricos de IgM e IgA foram significativamente maiores nas vacas que não foram vacinadas, o que refletiu no aumento da IgM no primeiro dia de vida dos bezerros nascidos destas vacas. O grupo das vacas vacinadas tiveram níveis séricos de IgG1 e níveis colostrais de IgG2 aumentados em relação às vacas do grupo controle, mas não houve diferenças significativas nos níveis de imunoglobulinas dos bezerros nascidos de vacas vacinadas ou não vacinadas. Em ambos os grupos houve excreção de rotavírus nas fezes, e, apesar de baixa ocorrência, um bezerro nascido de vaca vacinada excretou rotavírus posteriormente (aos 21 dias) aos dois bezerros nascidos de vacas não vacinadas (7 e 14 dias). Os resultados deste estudo demonstraram que a vacinação materna no terço final de gestação com vacina inativada retardou, mas não evitou a ocorrência da rotavirose.

Palavras-chave: bovinos, imunidade, rotavírus, vacina inativada.

ACTIVE AND PASSIVE IMMUNE RESPONSE INDUCED BY COMERCIAL VACCINE AGAISNT BOVINE ROTAVIRUSES

ABSTRACT- The aim of this study was evaluated the active and passive immunity against rotavirus induced by vaccination with an inactive commercial vaccine in cows and their respective calves from a farm of Cravinhos, state of São Paulo. The analysis of IgG, IgG1, IgG2 , IgM and IgA were done in serum 60 days before calving (before vaccination); 30 days before calving (before revaccination) and in the day of calving, with indirect ELISA. The levels of IgG, IgG1, IgG2, IgM and IgA in colostrum were evaluated in the day of calving, with the same technique. The levels of calves' immunoglobulin were evaluated in the day of born and 1, 7, 21 and 28 days of age. The secretion of rotavirus was evaluated in fecal samples of calves by SDS-PAGE. In this study, levels of IgM and IgA were increased in cows that were not vaccinated, and their calves, fed their colostrums, have levels of IgM increased one day after born. Vaccinated cows have serum IgG1 and colostral IgG2 higher than non vaccinated cows but statistics differences in levels of immunoglobulin were not found in calves. In both groups, was detected rotavirus in feces of calves, and besides the low occurrence in this study, one calf of vaccinated cow excreted rotavirus in day 21, while two calves born of non vaccinated cows excreted rotavirus with 7 and 14 days. In conclusion, the vaccination of cows with a commercial inactivated vaccine did not prevent the rotaviruses in calves.

Key words: bovine, immunity, rotavirus, inactivated vaccine.

1. INTRODUÇÃO

A diarreia neonatal é o principal problema sanitário que acomete os bezerros nas primeiras semanas de vida, causando grande prejuízo econômico devido à morbidade, mortalidade, custos com tratamento e atraso no desenvolvimento dos animais.

Os principais agentes etiológicos infecciosos da diarreia são os vírus (rotavírus e coronavírus), as bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp e *Clostridium perfringens*) e os protozoários (*Eimeria* sp) que atuam de forma isolada ou em associação. Além dos agentes infecciosos, a diarreia pode também ser causada por erros de manejo alimentar e higiênico.

O rotavírus causa diarreia aguda em vários mamíferos, humanos e aves e é pouco provável que seja erradicado, já que é excretado em grande quantidade nas fezes dos indivíduos acometidos e possui longa estabilidade no meio ambiente.

A vacinação de vacas no terço final de gestação é uma medida comumente utilizada por produtores de gado, principalmente leiteiro, para aumentar os níveis de anticorpos colostrais contra o rotavírus e, conseqüentemente, aumentar a imunidade passiva e proteção dos bezerros.

No Brasil, existem vacinas comercializadas que contém o rotavírus inativado em sua composição, entretanto os estudos a campo fornecem dados controversos em relação à proteção dos bezerros. Neste sentido, este trabalho foi idealizado para verificar a imunidade ativa induzida por vacinação de vacas e a imunidade passiva de seus respectivos bezerros, em uma mesma propriedade no município de Cravinhos, Estado de São Paulo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do rotavírus

Em 1969 o rotavírus bovino grupo A foi isolado em cultura celular, caracterizado e confirmado como agente causal da diarreia em bezerros (MEBUS et al., 1969). Naquela época foi identificado como reovírus, entretanto, em 1978, o “International Committee on Taxonomy of Viruses” propôs a criação do gênero *Rotavirus*, dentro da família *Reoviridae* (MATTHEWS, 1979 apud GREGORY, 1999).

O gênero *Rotavirus* é composto por vírus não envelopados, com estrutura esférica, medindo aproximadamente 72 nm de diâmetro, e é assim chamado devido ao seu capsídeo externo ser em forma de icosaedro que forma um aspecto de roda ao redor do ácido nucléico (LIU et al., 2010). O capsídeo é composto por três camadas denominadas capsídeo externo, capsídeo intermediário e capsídeo interno ou core e o genoma consiste de 11 segmentos de uma dupla fita de RNA (ds RNA) (ESTES & COHEN, 1989).

No total, seis proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6) são codificadas pelo rotavírus. Especificamente, as proteínas estruturais são codificadas pelos seus segmentos genéticos correspondentes. O segmento 5 codifica a NSP1, o segmento 8 a NSP2, o segmento 7 a NSP3, o segmento 10 a NSP4 e o segmento 11 a NSP5 e NSP6 (LIU et al., 2010) (Figura 1).

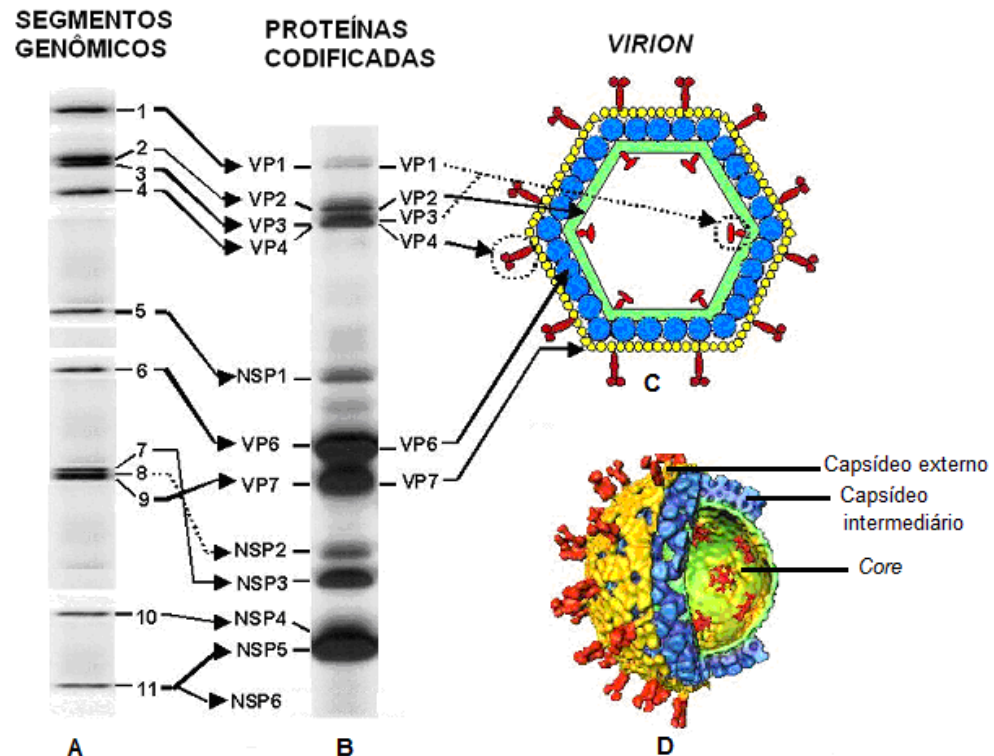


Figura 1. Esquema do genoma e proteínas codificadas pelo rotavírus. (adaptado de ESTES, 2001).

As proteínas não estruturais participam da transcrição do RNA viral, mas a proteína NSP4 é uma enterotoxina viral que aumenta a concentração de cálcio (Ca^{2+}) intracelular causando distúrbios na homeostase celular do hospedeiro (LIU et al., 2010).

As proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 situadas na camada interna também têm sua função ligada à transcrição viral. Na camada média, a VP6 é a proteína mais abundante, altamente imunogênica e antigênica, freqüentemente alvo para o diagnóstico e detecção da partícula viral (ESTES, 1996), mas não induz anticorpos neutralizantes (TANG et al., 1997). No capsídeo externo, saindo como uma espícula do virion a VP4 se liga a moléculas na superfície dos receptores das células hospedeiras o que facilita a penetração viral nas células (LIU et al., 2010). Esta proteína é responsável por várias funções biológicas. Na presença da tripsina, a VP4 é clivada em VP5 e VP8, e esta clivagem resulta em

um aumento da infectividade viral. Também no capsídeo externo, a proteína VP7 é uma glicoproteína altamente imunogênica que induz a formação de anticorpos neutralizantes.

O rotavírus possui três importantes especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipo (HOSHINO & KAPIKIAN, 2000).

A VP6 é responsável pela classificação do rotavírus em sete grupos denominados de A a G e também em subgrupos I e II. Os grupos A, B e C são os que mais ocorrem em mamíferos (ALFIERI et al., 1999; ESTES, 2001), porém, o rotavírus bovino do grupo A é o mais comumente associado com a diarreia neonatal dos bezerros (LUCHELLI et al., 1992).

As proteínas VP4 e VP7 determinam independentemente os sorotipos do rotavírus (HOSHINO & KAPIKIAN, 2000). Anticorpos neutralizantes anti- VP4 são utilizados para determinar o sorotipo P (sensibilidade à protease) e anticorpos neutralizantes anti-VP7 são utilizados para determinar o sorotipo G (de glicoproteína) (ESTES & COHEN, 1989).

O grupo de trabalho de classificação do rotavírus (“Rotavírus Classification Working Group”) sugeriu um guia para nomenclatura das estirpes de campo de rotavírus da seguinte maneira:

- Grupo/espécie do rotavírus
- Origem da espécie
- País de identificação
- Nome comum
- Ano da identificação
- Tipo-G
- Tipo-P

Dentro do rotavírus do grupo A há uma predominância do sistema dual de classificação das amostras (tipos G e P), entretanto, em Abril de 2008, um sistema de classificação completa do genoma do rotavírus foi desenvolvido, baseado nos 11 segmentos genômicos. As proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 foram descritas utilizando as seguintes abreviações

Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, sendo x um número arábico iniciando por 1 (MATTHIJNSSENS et al., 2011)

As técnicas moleculares classificam o rotavírus através da genotipagem, sendo que apenas para a proteína VP7 existe correlação entre sorotipagem e genotipagem (KAPIKIAN & CHANOCH, 1990 apud SILVA, 2004). Em 2011, foram descritas novas estirpes AzuK-1 G21P[29] isolada de bezerro assintomático e Daí-10 G24P[33] assinalado pelo grupo de trabalho de classificação do rotavírus em uma vaca assintomática no Japão (ABE et al., 2011).

A rotavirose bovina tem sido caracterizada com pelo menos três tipos G: (G6, G8 e G10) e três tipos P: (P[1], P[5], P[11]) (SAIF & FERNANDEZ, 1996).

2.2 Patogenia, manifestação clínica e diagnóstico

A rotavirose ocorre já nos primeiros dias de vida, sendo que em bezerros jovens (2 dias de idade) mesmo estirpes consideradas de baixa virulência podem causar sinais clínicos, enquanto animais com idades superiores (2 semanas de idade) apenas manifestam sinais clínicos quando infectados com estirpes virulentas (BRIDGER, 1994).

O rotavírus entra no organismo hospedeiro através da via fecal-oral e uma vez que sobrevive ao pH ácido do trato gastrointestinal do hospedeiro, infecta as células epiteliais das vilosidades do intestino delgado (LIU et al., 2010). A infecção das células presumivelmente se inicia com a interação com o receptor que provavelmente contém o ácido siálico, pelo menos para as estirpes SA11 e NCDV (ESTES & COHEN, 1989), entretanto LIU et al. (2010) citam que receptores baseados em galactose bem como co-receptores como integrina podem estar envolvidos na endocitose do vírus. Além da endocitose mediada pelo receptor pode ocorrer penetração direta através da membrana, significando que o mecanismo de penetração ainda não é claro (LIU et al., 2010).

Através da ação coordenada da proteína VP7 e espícula VP4 o vírus rompe a membrana do endossomo e se multiplica dentro das células causando alterações estruturais e funcionais. O RNA viral depende da RNA polimerase para gerar mRNA e a transcrição no viroplasma ocorre ao redor do núcleo celular onde se acumula a maioria das proteínas virais. Após a migração para o retículo endoplasmático os vírus adquirem suas outras camadas do capsídeo (VP7 e VP4) tornando-se vírus infecciosos e são liberados após lise celular (ESTES & COHEN, 1989; LIU et al., 2010).

O período de incubação do rotavírus é de 24 horas, com a resolução em 2 dias se a diarreia não for complicada. A diarreia ocorre devido à má absorção pela perda de área absorptiva e acúmulo de glicose e outros carboidratos no lúmen intestinal que aumentam a pressão osmótica acarretando um aumento de líquidos. Além disso, a secreção das criptas também aumenta a quantidade de líquido. A severidade da diarreia clínica nem sempre é correlacionada com o dano da vilosidade (FOSTER & SMITH, 2009).

As partículas virais são eliminadas pelos animais durante a fase aguda da diarreia, em torno de 10^{11} partículas/mL de fezes (KOOPMANS & DUIZER, 2004).

A principal ferramenta diagnóstica para a rotavirose é a sua observação e identificação por microscopia eletrônica. Para facilitar a sua identificação, pode-se cultivar o rotavírus em cultura primária de células de rim de bezerro bem como em células de linhagens como MA104, MDBK ou PK-15. Outros procedimentos para o diagnóstico incluem a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), que detecta o RNA viral, contraímuno-eletroforese, técnicas de ensaios imunoenzimáticos, “imunoblotting”, teste de imunofluorescência, teste de imunoperoxidase, teste de hemaglutinação, teste de aglutinação em látex dentre outras (LIU et al., 2010). A técnica qRT-PCR demonstrou ser mais sensível e específica que as técnicas de ELISA e aglutinação em látex (IZZU et al., 2010).

2.3 Ocorrência de rotavírus em rebanhos bovinos brasileiros

JEREZ et al. (1987) foi um dos primeiros pesquisadores a identificar anticorpos anti-rotavírus em rebanhos leiteiros brasileiros, constatando positividade em 29% das amostras de fezes diarréicas de 120 bezerros machos e fêmeas de diversas raças, com até 30 dias de idade em fazendas leiteiras de 14 municípios do Estado de São Paulo, através da técnica de ELISA.

No Estado de Minas Gerais, BARBOSA et al. (1998) avaliaram a frequência do rotavírus do grupo A em 194 amostras de fezes de bezerros e encontraram positividade em 17% das amostras em 19 propriedades, sendo que destas 60,6% apresentavam diarreia no momento da amostragem.

Também no Estado de São Paulo, BUZINARO et al. (2000) analisaram 375 amostras de fezes de bezerros e encontraram 11,2% das amostras positivas, sendo que 15% destas foram obtidas de animais com diarreia e 7,1% obtidas de animais sem diarreia, através do ensaio imunoenzimático e eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

No município de Hidrolândia, Estado de Goiás, BRITO et al. (2000) investigaram as fezes de bezerros com menos de 30 dias em um surto de diarreia e encontraram nove amostras positivas para rotavírus pertencentes ao grupo A/subgrupo I e uma amostra do grupo A subgrupo não I e não II.

Em 2002, JEREZ et al. encontraram uma ocorrência de 14% de rotavírus em 72 fezes diarréicas de bezerros e BUZINARO & FREITAS (2002) detectaram 4,9% das amostras positivas no nordeste do Estado de São Paulo, através da técnica SDS-PAGE. Já através da análise de soro pela técnica de contraímuno-eletroforese, BRANDÃO et al. (2002) encontraram soropositividade total de 77,5% das amostras, demonstrando a elevada ocorrência de infecções naturais por rotavírus no Estado de São Paulo.

ALFIERI et al. (2004) genotiparam 50 amostras positivas para rotavírus do grupo A nos Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná e relataram que

12% das amostras positivas correspondiam ao rotavírus como NCDV, 40% como rotavírus UK, 16% como B223 e 2% KN-4. As infecções mistas foram detectadas em 7 amostras (14%) e duas amostras apresentaram combinação incomum, sendo o gene VP4 e o VP7 de rotavírus bovino grupo A (G8P[11]) e outro gene VP4 de origem bovina (P[1]) e VP7 de origem suína (G5).

No período entre 1998 a 2002, ALFIERI et al. (2006) estudaram a frequência de rotavírus em rebanhos bovinos de sete Estados (Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Rondônia) através do SDS-PAGE totalizando 2.177 amostras. O rotavírus bovino do grupo A foi detectado em 19,4% das amostras diarréicas e somente em 2,2% das fezes normais. A proporção de amostras positivas no gado de corte foi de 22,8% e no gado de leite 16,4%. Com relação à idade, a maior prevalência das infecções foi encontrada em animais com mais de 30 dias de idade.

SALLES et al. (2009) também em São Paulo, estudaram rebanhos bovinos de corte e de leite e encontraram o rotavírus em 33,3% dos rebanhos e 8,6% da população amostrada. A ocorrência em rebanhos leiteiros foi de 5,3% e, em rebanhos de corte, 15,3%. A genotipagem de 17 de 23 amostras positivas revelou que as estirpes circulantes eram G6P[5] e G10P[5].

FREITAS et al. (2011) em um estudo que abrangeu 51 rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo encontraram uma prevalência de rotavírus em 21,6% dos rebanhos e 6,7% dos bezerros, sendo encontrados os genótipos G6P[5] e G10P[11] e o genótipo G?P[1].

Também em Goiás, CARUZO et al. (2010) avaliaram 331 amostras nas quais encontraram 9,9% de positivas. Neste estudo o genótipo G6 foi o mais prevalente (64,5%) seguido pelo genótipo G10 detectado em 32,2% das amostras testadas. Foram caracterizadas 32,2% das amostras como P[11] e 9,7% como P[1].

2.4 Prevenção da rotavirose em bezerros

A aplicação de medidas sanitárias, manejo e alimentação adequados, sobretudo nos primeiros dias de vida, podem reduzir significativamente a mortalidade e os gastos com tratamento de enfermidades em bezerros (BOTTEON et al., 2008).

Após se desenvolver no ambiente estéril do útero, os mamíferos nascem em ambientes ricos em microrganismos e para sobreviver o animal recém-nascido deve ser capaz de controlar a infecção microbiana. Na prática, o sistema imune leva algum tempo para se tornar completamente funcional e os mecanismos inatos são os responsáveis pela resistência inicial à infecção, entretanto, os recém nascidos também são protegidos pela transferência da imunidade da mãe para a prole (TIZARD, 2008).

Diferentemente dos humanos que possuem a placenta hemocorial, os animais que possuem a placenta sindesmocorial como os bovinos nascem agamaglobulêmicos e adquirem as imunoglobulinas somente via ingestão de colostro nas primeiras 48 horas de vida (SAIF & FERNANDEZ, 1996; TIZARD, 2008).

O colostro contém as secreções acumuladas da glândula mamária nas últimas semanas de gestação, juntamente com as proteínas ativamente transferidas a partir da corrente sangüínea, portanto é rico em imunoglobulinas das classes IgG e IgA, mas também possui uma quantidade de IgM e IgE (TIZARD, 2008).

O termo imunoglobulina é usado para descrever todos os receptores de antígenos dos linfócitos B (BCRs) solúveis. A imunoglobulina da classe G é encontrada em maiores concentrações no sangue sendo fundamental nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos. A IgG bovina é uma mistura de três subclasses (IgG1, IgG2 e IgG3) que diferem quanto às suas seqüências de aminoácidos e propriedades físicas como a mobilidade eletroforética. A IgG1 é a imunoglobulina predominante no leite das vacas e os níveis de IgG2 são

nitidamente herdados e estas subclasses apresentam diferentes atividades biológicas como, por exemplo, a IgG2 bovina aglutina partículas antigênicas enquanto que a IgG1 não o faz. (TIZARD, 2008).

A IgM tem a segunda maior concentração no soro da maioria dos mamíferos e é a principal imunoglobulina produzida durante uma resposta imune primária. É mais efetiva que a IgG na ativação do sistema complemento, na opsonização, na neutralização de vírus e na aglutinação. A IgA é produzida nas superfícies corpóreas e tem importância crítica na proteção do trato intestinal, respiratório e urogenital, glândula mamária e olhos contra a invasão microbiana, podendo neutralizar vírus, entretanto, no intestino sua função mais importante é a exclusão imune que não permite a aderência de vírus e bactérias nos enterócitos (TIZARD, 2008).

Até a década de 80, o mecanismo da imunidade passiva para infecções entéricas não estava bem definido. Numerosos estudos documentavam a importância da presença contínua de anticorpos locais no lúmen intestinal para a efetiva proteção contra vírus entéricos que infectam a vilosidade das células epiteliais. Anticorpos séricos, embora não essenciais para a proteção destes enterócitos pareciam providenciar alguma proteção em altos títulos (SAIF et al., 1983).

As primeiras vacinas comerciais contra rotavírus eram vivas e modificadas e, em um experimento, foram administradas pela via oral em bezerros dentro das 24 horas depois do nascimento, após um surto de diarreia no Canadá. Os pesquisadores relataram que a vacinação não reduziu a incidência ou a severidade da diarreia (ACRES & RADOSITIS, 1976).

Na década de 80, a estratégia de vacinação contra rotavírus foi alterada. Ao invés da vacinação dos bezerros, SNODGRASS et al. (1980) vacinaram novilhas pela via intramuscular e encontraram níveis colostrais de IgA e principalmente de IgG1 aumentados nos animais vacinados. Este aumento dos anticorpos lácteos atrasou o estabelecimento da infecção por rotavírus nos bezerros alimentados com aqueles colostros.

Posteriormente, SAIF et al. (1983) compararam a concentração de imunoglobulinas do colostro de vacas vacinadas com vacina experimental, aplicada pelas vias intramuscular e intramamária, vacas vacinadas com vacina comercial, aplicada pela via intramuscular e vacas não vacinadas. As vacas vacinadas com a vacina experimental obtiveram níveis significativamente maiores de IgG1 no colostro e os bezerros alimentados com este colostro ficaram protegidos quando desafiados com rotavírus.

Para avaliar se a IgG1, que protegia os bezerros, era proveniente do colostro não absorvido ou se correlacionava com os níveis séricos, BESSER et al. (1988) avaliaram a imunidade passiva associada com a transferência de anticorpos séricos para o lúmen intestinal e encontraram correlação entre anticorpos neutralizantes presentes no intestino com os anticorpos séricos e concluíram que os anticorpos intestinais eram provenientes da circulação e não remanescentes do colostro, o que também foi confirmado posteriormente por PARREÑO et al. (2004).

SNODGRASS et al. (1984) avaliaram a influência de sorotipos na resposta imune e verificaram não haver proteção cruzada entre dois sorotipos em bezerros. Entretanto, verificaram aumento de títulos para cinco tipos de rotavírus em vacas vacinadas com vacina monovalente, quando estas possuíam anticorpos neutralizantes preexistentes, deduzindo que a vacinação com um sorotipo poderia ser satisfatória para as vacas.

WOODE et al. (1987) encontraram resultados diferentes ao verificarem que a estirpe B223 (G10P[11]) de rotavírus possuía proteção cruzada com a B641 (G6P7[5]), mas esta não protegia contra a estirpe B223. Neste estudo, concluiu-se que títulos de anticorpos séricos e coprológicos mensurados por neutralização em placa não predizem o status de proteção contra vírus desafio, já que bezerros vacinados com NCDV (G6P[1]) ou B641 desenvolveram anticorpos neutralizantes para seus respectivos desafios heterólogos, mas, não ficaram protegidos. As falhas da proteção vacinal foram atribuídas na época à presença de bloqueio por

anticorpos colostrais, pobre resposta à vacinação dos animais ou a presença de sorotipos diferentes da vacina.

Na década de 90, com advento da biologia molecular, novas tecnologias foram desenvolvidas e vacinas recombinantes começaram a ser testadas para a prevenção da rotavirose.

FERNANDEZ et al. (1996), compararam uma vacina tradicional inativada com duas vacinas de subunidades expressas em baculovírus: CLP (constituída pela VP2 e VP6) e VLP (constituída pela VP2, VP4, VP6 e VP7). As vacas foram vacinadas pela via intramuscular nove semanas antes do parto e pela via intramamária sete semanas antes do parto. A média geométrica dos títulos avaliados por ELISA para IgG1, IgA, IgM e IgG2 foram significativamente maiores nos soros dos grupos vacinados em relação ao grupo controle. No colostro e leite, os autores verificaram aumento significativo de IgG1, IgA e IgM nas vacas vacinadas com a vacina VLP; IgG1, IgG2, IgA e IgM nas vacas vacinadas com CLP. As vacas vacinadas com a vacina inativada também demonstraram aumento significativo de IgG1, IgA e IgM, apesar dos valores serem mais baixos que as outras vacinas.

Posteriormente, FERNANDES et al. (1998) avaliaram a proteção contra rotavírus em bezerros suplementados com o colostro contendo anticorpos neutralizantes das vacas vacinadas com VLP, CLP, vacina inativada, colostro de vacas não vacinadas ou privados de colostro. Os bezerros foram oralmente desafiados com uma estirpe virulenta heteróloga do rotavírus aos 2 e 21 dias de idade. Os níveis séricos e fecais de IgG1 foram maiores nos bezerros alimentados com o colostro de vacas vacinadas com a VLP e CLP. Após o desafio, uma quantidade menor de bezerros filhos de vacas vacinadas com as vacinas CLP e inativada manifestou diarreia e excreção de rotavírus em comparação aos grupos controles e nenhum bezerro alimentado com o colostro VPL manifestou diarreia. A imunidade ativa avaliada pelo aumento de IgM ocorreu nas fezes e/ou no soro da maioria dos bezerros após inoculação do rotavírus. Entretanto, a maior atividade de resposta humoral (IgM e IgG no soro e IgM, IgG1 ou IgA nas fezes), após a

inoculação, foi nos grupos controles, em associação com a manifestação clínica de diarreia na maioria destes animais. Após o segundo desafio, a diarreia e a excreção viral foi menor ou ausente em todos os grupos.

Continuando os estudos com vacinas VLP, KIM et al. (2002) avaliaram vacinas multivalentes com os sorotipos predominantes IND (G6P[5]) e 2292B (G10P[11]) e concluíram que pelo menos dois diferentes sorotipos podem ser misturados para conferir uma máxima resposta humoral aos sorotipos incorporados.

GONZALES et al. (2010) avaliaram a eficácia de uma vacina recombinante VP6, estirpe C-486 (P1G[6]) administrando o colostro das vacas vacinadas para bezerros, que demonstraram uma redução da diarreia e excreção viral em relação ao grupo controle.

Além das vacinas experimentais, no Japão, KOHARA et al. (1997) avaliaram a imunidade passiva a campo de uma vacina polivalente européia (Lactovac; Hoechst, Germany) contendo rotavírus do grupo A V1005/78 (G10P[5]) e Holland (G6P[1]), ambos em títulos de $10^{7,5}$ TCID₅₀/5mL, e encontraram que a vacinação aumentou os títulos séricos e colostrais de anticorpos para rotavírus das vacas vacinadas e os níveis séricos de anticorpos nos bezerros, comparados ao grupo controle; entretanto, os bezerros excretaram rotavírus G10P[11], sendo o genótipo P diferente do presente na vacina.

Em um outro estudo realizado no Irã, MOHAMMADI et al. (2004) avaliaram uma vacina comercial multivalente (Kolibin RC) e verificaram que a vacinação das vacas não ajudou na redução da incidência de diarreia neonatal nos bezerros.

No Brasil, poucos trabalhos a campo com vacinas comerciais foram realizados. SILVA et al. (2008) monitoraram a imunidade passiva de bezerros alimentados com colostro de vacas imunizadas e não imunizadas contra rotavírus bovino, estirpe NCDV Lincoln (G6), constatando que tanto no soro sanguíneo quanto no colostro, os títulos de IgG, IgG1 e IgG2 foram maiores no grupo de animais vacinados, porém, esse aumento foi estatisticamente significativo apenas no colostro. Também encontraram que os bezerros alimentados com o colostro

das vacas vacinadas apresentaram títulos mais altos das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2, IgA e IgM sendo que o aumento foi significativo apenas para IgA, entretanto, a vacinação não protegeu os bezerros das infecções naturais por não ser capaz de impedir a ocorrência da rotavirose.

As vacinas comercializadas no Brasil até o presente momento são produzidas em outros países e contém estirpes das regiões onde são produzidas como NCDV Lincoln (G6P[1]), UK (G6P[5]) e B223 (G10P[11]) (SILVA, 2004) e este estudo justifica-se por avaliar em condições a campo, em uma mesma propriedade, uma vacina comercial que contém a cepa T67 (G6) e B223 (G10).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar a imunidade ativa induzida por vacinação de vacas no terço final da gestação com vacina comercial contendo rotavírus inativado (G6 e G10) e a imunidade passiva dos bezerros nascidos e alimentados com o colostro das vacas vacinadas e não vacinadas.

Avaliar a relação entre a resposta imune passiva nos bezerros nascidos de vacas imunizadas e não imunizadas associada à detecção de rotavírus nas fezes.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar os níveis séricos de imunoglobulinas anti-rotavírus em vacas vacinadas e não vacinadas antes da vacinação (D-60), antes da revacinação (D-30) e no dia do parto (D0).

Avaliar os níveis colostrais de imunoglobulinas anti-rotavírus no dia do parto em vacas vacinadas e não vacinadas.

Avaliar os níveis séricos de imunoglobulinas anti-rotavírus em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas, que mamaram seus respectivos colostros.

Avaliar a associação entre a excreção fecal do rotavírus em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Manejo dos animais e colheita das amostras

O experimento foi realizado em uma propriedade leiteira no município de Cravinhos, Estado de São Paulo, produtora de 7.000 litros de leite/dia, com ordenha três vezes ao dia no sistema “free stall”, no período de junho/2011 a abril/2012. As vacas da raça holandesa foram mantidas em confinamento e alimentadas com feno, silagem de milho, farelo de soja, milho moído, caroço de algodão, polpa cítrica, suplemento mineral e receberam água “*ad libitum*”.

Sessenta dias antes da data de parição, dezenove (19) vacas foram aleatoriamente classificadas no grupo 1 (vacas vacinadas n=9) e grupo 2 (vacas não vacinadas n=10). Trinta dias após a primeira dose, todo o lote experimental foi transferido para o piquete maternidade.

A vacina comercial (Rotatec®- Biogênese Bagó) utilizada contém em sua composição rotavírus bovino estirpe T67 (sorotipo G6), estirpe B223 (sorotipo G10) e *Escherichia coli* J5 mutante rugosa cepa O111:B4 inativados, com adjuvante oleoso, e foi aplicada conforme instrução do fabricante na dose de 3 mL pela via subcutânea.

Cada bezerro neonato ficou com sua mãe para mamar o colostro durante o primeiro dia de vida e, a partir do segundo dia, foi transferido para bezerreiros individuais e alimentado com “pool” de leite das vacas da propriedade, no balde, duas vezes ao dia, permanecendo neste local durante todo o período experimental (Figura 2).



Figura 2. Bezerreiros da fazenda.

Os momentos das amostragens e os tipos de amostras estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1: Momentos de amostragem e tipos de amostras colhidas das vacas vacinadas e não vacinadas e seus respectivos bezerros.

Vacas			Bezerros					
D-60	D-30	D0	D0	D1	D7	D14	D21	D28
sangue	sangue	sangue	sangue	sangue	sangue	sangue	sangue	sangue
		colostro	fezes	fezes	fezes	fezes	fezes	fezes

D-60: dia da vacinação e 60 dias antes do parto; D-30: dia da revacinação e 30 dias antes do parto; D0: dia do parto; D1: até 1 dia após o nascimento, D7: 7 dias após o nascimento; D14: 14 dias após o nascimento; D21: 21 dias após o nascimento e D28: 28 dias após o nascimento.

O sangue foi colhido através da venopunção da veia mamária das vacas e jugular dos bezerros, em tubos a vácuo, siliconados, estéreis, sem anticoagulante, identificados com o número do animal e a data. O sangue colhido foi imediatamente armazenado sob refrigeração para deslocamento até o laboratório. As fezes foram colhidas diretamente da ampola retal em luvas plásticas e armazenadas em frascos universais e o colostro colhido através de ordenha manual de cada um dos tetos, sendo reunido em uma única alíquota por animal ("pool") em tubos plásticos de 50 mL, identificados com o número do animal e data.

4.2 Processamento das amostras

No laboratório, o sangue colhido foi centrifugado a 1.831 xg em centrífuga refrigerada a 4°C (Excelsa 4, Modelo 280R, FANEM). O soro obtido pela centrifugação foi armazenado, em duplicata, em tubos plásticos de 2,0 mL identificados, em freezer a -20°C até o momento das análises.

Para obtenção do soro lácteo no colostro, foi adicionado renina (coagulante Estrela[®]), na proporção de 5% do volume da amostra a ser processada. Após incubação a 37°C, por 20 minutos, em banho-maria, as amostras foram centrifugadas a 1.831 xg, por 30 minutos a 15°C. As alíquotas de soro lácteo foram congeladas a -20°C até o momento das análises.

As fezes após coleta foram congeladas a -20°C até o momento das análises.

4.3 Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA indireto) para detecção de anticorpos anti-rotavírus no soro sanguíneo e no colostro

O antígeno de rotavírus bovino, estirpe UK (G6P[5]) (contendo $3,53 \times 10^7$ UFP/mL), utilizado no teste de ELISA e gentilmente cedido pelo laboratório Biogênese da Argentina, foi precipitado através da técnica descrita por KILLINGTON et al. (1996) com algumas alterações.

Para semipurificar o antígeno, foi adicionado PEG 6000 a uma concentração final de 7% em 250 mL de antígeno, sob agitação magnética, durante 1 hora para completa solubilização, com posterior refrigeração a 4°C, durante uma noite para a precipitação. Posteriormente, o antígeno com PEG foi centrifugado a 1.831 xg em centrífuga refrigerada a 4°C (Excelsa 4, Modelo 280R,

FANEM), durante 30 minutos, para formação do “pellet”, que foi ressuspendido em 15 mL de PBS.

A determinação de imunoglobulinas (IgG, IgG1, IgG2, IgM e IgA) anti-rotavírus no soro sanguíneo e colostro foi realizada através de ensaio imunoenzimático indireto, de acordo com a técnica descrita por FERNANDEZ et al. (1996) e SILVA (2004) com algumas modificações.

Para sensibilização das placas, empregou-se 50 µL de antígeno viral em cada um dos 96 poços na diluição 1:8, estabelecida por SILVA (2004), em tampão carbonato/bicarbonato, 0,05M, pH 9,6. As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C.

Foram realizadas quatro lavagens sucessivas com 250 µL por poço em cada lavagem, com solução salina 0,85%, preparada imediatamente antes de cada experimento, em lavadora automática (WellWash 4NK2- Thermo Scientific).

Após a lavagem das microplacas foram adicionados 100 µL/poço de solução bloqueadora, contendo ovoalbumina grau V (Sigma) a 1,5% diluída em PBS. As placas foram incubadas durante 1 hora a 37°C, em câmara úmida, e depois, lavadas como descrito anteriormente.

Em todas as placas foi utilizado um soro controle positivo gentilmente cedido pela médica veterinária Thais Gomes Rocha, colhido de um bezerro que havia excretado rotavírus nas fezes pela técnica do PAGE e previamente titulado, em diluições que proporcionaram densidades ópticas (DOs) ao redor de 1,0 a 2,0. O soro controle negativo foi colhido de um bezerro do experimento, antes da mamada do colostro e previamente titulado, em diluições que proporcionaram densidades ópticas (DOs) de 0,1 a 0,2. As reações inespecíficas foram controladas pelo controle branco da prova que deveria apresentar valores $\leq 0,1$ de DO.

Baseado nos resultados da titulação do soro positivo e negativo, utilizou-se para a pesquisa das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2, IgM e IgA uma diluição do soro sanguíneo de cada amostra de 1:200, 1:100, 1:25, 1:800 e 1:25 respectivamente, em tampão de PBS contendo 0,05% de “Tween 20” e 1%

ovoalbumina Grau II (PBSTOII). No colostro as diluições para IgG, IgG1, IgG2, IgM e IgA foram 1:800; 1:1.600, 1:800, 1:1600 1:800, no mesmo tampão acima descrito.

As amostras diluídas foram transferidas para as placas (50 µL por poço) em duplicata e foram incubadas durante 1 hora a 37°C, em câmara úmida, com agitação durante os primeiros 20 minutos, para melhor homogeneização dos reagentes. Após a incubação, as placas foram lavadas com solução salina (0,85%) adicionada de 0,05 % de “Tween 20”.

Foram adicionados 50 µL por cavidade das seguintes diluições dos conjugados imunoenzimáticos (imunoglobulinas ligadas à enzima peroxidase), diluídos no tampão PBSTOII:

Tabela 2: Diluições utilizadas dos conjugados imunoenzimáticos na técnica de ELISA indireto.

Conjugado	Diluição	Fornecedor
IgG de coelho anti IgG bovino	1 : 1000	Sigma-Aldrich -EUA
IgG de ovino anti IgG1 bovino	1: 500	Bethyl Laboratories -EUA
IgG de ovino anti IgG2 bovino	1:200	Bethyl Laboratories -EUA
IgG coelho anti IgM bovino	1:4000	Bethyl Laboratories -EUA
IgG coelho anti IgA bovino	1:1000	Bethyl Laboratories -EUA

As placas foram incubadas durante 1 hora a 37° em câmara úmida, com agitação, e posteriormente lavadas com solução salina (0,85%) adicionada de 2% de “Tween 20”.

Para finalizar a reação, foram adicionadas 50 µL por cavidade de uma solução cromógena contendo 2 mg de ortofenilenodiamino (OPD) diluída em 5,5 mL de solução de citrato de sódio fosfato, pH 4,9-5,2, acrescida de peróxido de hidrogênio a 3%. A placa foi incubada durante 15 minutos, a temperatura ambiente, sob proteção da iluminação direta. A reação foi bloqueada com a adição de 50 µL, por cavidade, de solução de ácido clorídrico (HCl) 2M e as leituras das

densidades óticas (DO) foram realizadas em leitor de microplaca (Multiskan EX-Thermo Scientific- EUA) a um comprimento de onda de 492 nm.

As médias das DOs para cada amostra teste foram transformadas em valor amostra/positivo (A/P), calculado através da seguinte fórmula:

$A/P = Z - X / Y - X$, onde:

Z= DO média da amostra teste

X= DO média do controle negativo

Y= DO média do controle positivo

Como as amostras de soro sanguíneo e de colostro foram analisadas em diferentes diluições por classe de imunoglobulina, as diferenças foram corrigidas multiplicando-se os valores de A/P de cada amostra pelo fator de diluição dos soros.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise da presença de rotavírus nas fezes foi realizada através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo PEREIRA et al. (1983), com algumas modificações.

Aproximadamente 0,25g de fezes foram ressuspensas em 1,0 mL de tampão Tris/HCl/Ca²⁺, pH 7,3, 0,1M, homogeneizadas e mantidas a temperatura ambiente, durante 30 minutos, com agitação em “vórtex” a cada 10 minutos.

Posteriormente, foram centrifugadas a 13.201 xg durante 15 minutos e 400 µL do sobrenadante foi transferido para microtubos que foram adicionados de 40 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS a 10%) e incubados em banho-maria a temperatura de 37°C, durante 30 minutos.

Para extração do ácido nucléico viral, foram adicionados 200 µL de fenol e 200 µL de clorofórmio em cada tubo, permanecendo a temperatura ambiente por 15 minutos, com agitação a cada 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram

centrifugadas a 13.201 $\times g$ por 15 minutos, sendo o sobrenadante transferido para microtubos contendo 40 μ L de NaCl a 20%.

Foi adicionado 1 mL de etanol refrigerado a 4°C, em cada tubo e as amostras foram homogeneizadas e mantidas a -20°C por 18 horas.

Após este período os tubos foram centrifugados a 13.000 $\times g$ em centrífuga refrigerada a 4°C (Excelsa 4, Modelo 280R, FANEM- Brasil), durante 30 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi seco em temperatura ambiente. O “pellet” formado foi ressuspendido em 20 μ L de dissociador de amostra (3% SDS, 12,5% Tris/HCl 0,5M pH 6,8; 5% 2-mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol; 40% de glicerol) e posteriormente incubado em banho maria a 37°C por 30 minutos, estando pronto para aplicação no gel de poliacrilamida.

Para preparar o gel, foi utilizada solução estoque de acrilamida/bisacrilamida na concentração 30/0,8.

O gel inferior (acrilamida 7,5%-bisacrilamida 0,2% em tampão Tris/HCl 3mM pH 8,8; TEMED 0,2%, persulfato de amônio 0,03mM) e, posteriormente, o gel superior (acrilamida 3,5%-bisacrilamida 0,045% em tampão Tris/HCl 6mM pH 6,8; TEMED 0,2%, persulfato de amônio 0,015%) foram distribuídos no espaço formado entre as duas placas de vidro (9,0 x 9,0 cm) separadas por espaçadores de 1,0 mm de espessura, inseridos no sistema para eletroforese (Hoefer-EUA). Imediatamente após a distribuição do gel, foi colocado um pente na depressão superior para a formação das canaletas.

Após a polimerização, o gel foi colocado na cuba de corrida, preenchendo-se os reservatórios da cuba com tampão Tris/glicina (0,025M; 0,109M pH 8,3). A corrida foi realizada a 20mA/placa durante 2 horas.

Ao término da corrida, o gel foi lavado três vezes com água destilada e fixado em solução de etanol (10%) e ácido acético (1%) sob agitação. Posteriormente foi corado com nitrato de prata 0,011 M durante 1 hora. O gel foi lavado para retirada do excesso do corante e foi adicionada a solução reveladora de hidróxido de sódio 0,75M e formaldeído (0,95%) até a visualização do RNA viral (HERRING et al., 1982).

O processo de coloração foi bloqueado com a adição de solução de ácido acético 5% e o gel foi conservado em solução de etanol 10%. Os géis positivos foram posteriormente digitalizados (Scanner HP 6800).

4.5 Análise estatística

Análise de variância de medidas repetidas (ANOVA) foi o método estatístico usado para avaliar os dados tabulados. Comparações de médias aos pares foram feitas utilizando-se o teste de Tukey. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, tendo como fontes de variação os grupos (vacinados e controle), os momentos e as interações entre momentos e grupos. A associação entre a presença do rotavírus nas fezes de animais vacinados e não vacinados foi analisada pelo teste exato de Fischer. Todos os resultados foram obtidos com o programa SAS (SAS V 9-2010) (PETRIE & WATSON, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Níveis séricos de imunoglobulinas anti-rotavírus em vacas vacinadas e não vacinadas antes da vacinação (D-60), antes da revacinação (D-30) e no dia do parto

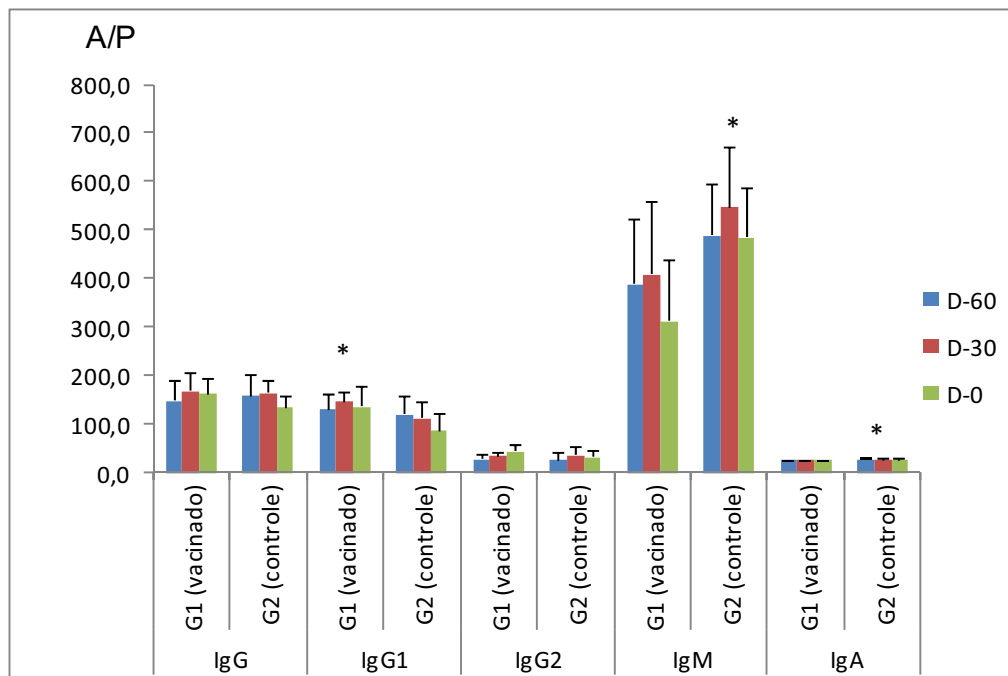
Os níveis séricos médios das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2, IgM, e IgA em valores de A/P, corrigidos pela diluição dos soros, estão relacionados na tabela 3.

Tabela 3: Níveis séricos médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto, em vacas vacinadas e não vacinadas contra rotavírus, 60 e 30 dias antes do parto e no dia do parto.

Imunoglobulinas e Grupos	Tempo					
	D-60		D-30		D-0	
IgG						
Grupo 1 (vacinado)	148,2 ±	42,2	168,0 ±	37,0	161,8 ±	31,2
Grupo 2 (controle)	158,3 ±	40,5	163,6 ±	23,4	133,5 ±	24,9
IgG1						
Grupo 1 (vacinado)*	130,0 ±	29,4	145,5 ±	18,1	135,9 ±	42,4
Grupo 2 (controle)	119,9 ±	36,0	111,9 ±	31,3	85,6 ±	33,7
IgG2						
Grupo 1 (vacinado)	26,6 ±	10,4	33,0 ±	8,0	43,9 ±	13,8
Grupo 2 (controle)	24,8 ±	14,1	35,5 ±	18,6	30,6 ±	13,3
IgM						
Grupo 1 (vacinado)	387,9 ±	133,4	407,5 ±	151,6	311,4 ±	42,4
Grupo 2 (controle)*	488,4 ±	106,6	546,0 ±	122,6	485,2 ±	102,3
IgA						
Grupo 1 (vacinado)	25,3 ±	0,4	25,4 ±	0,2	25,1 ±	0,6
Grupo 2 (controle)*	26,2 ±	0,6	25,9 ±	0,9	25,9 ±	1,1

* p<0,05 pelo teste de Tukey

A partir dos dados das tabelas 2 foi elaborada a figura 3, com os valores das médias dos grupos.



* $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Figura 3. Níveis séricos médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto, antes da vacinação (D-60), antes da revacinação (D-30) e no dia do parto em vacas vacinadas comparativamente com vacas não vacinadas (controle).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos e os momentos para a IgG.

Para a IgG1 houve diferença significativa entre os grupos, sendo que grupo das vacas vacinadas apresentaram, em média, os maiores valores pelo teste de Tukey.

Estes dados corroboram com os achados de KIM et al. (2002) que detectaram níveis de IgG1 significativamente aumentados após a vacinação com vacina recombinante (VLP) e FENANDEZ et al. (1996) que verificaram níveis

aumentados da IgG1 em vacas vacinadas com a vacina VLP, CLP e vacina comercial composta pela estirpe SA11 inativada.

SAIF et al. (1984) também verificaram níveis de IgG1 aumentados em vacas vacinadas com vacina viva modificada aplicada pelas vias intramuscular (IM) e intramamária (IMm), mas não houveram diferenças entre vacas vacinadas pela via IM com uma vacina comercial viva modificada e vacas não vacinadas.

Para a imunoglobulina IgG2, apesar da interação entre momentos e grupos não ter sido significativa a 5% ($p=0,25$) em uma análise mais detalhada verificou-se que o grupo das vacas vacinadas apresentaram valores maiores que o grupo das vacas não vacinadas no momento do parto, indicando um possível efeito da vacinação para esta imunoglobulina.

Os níveis séricos aumentados de imunoglobulinas da classe G em animais vacinados eram esperados uma vez que a literatura relata que a exposição a um antígeno estimula a produção de células de memória e conseqüentemente, após uma segunda exposição, a IgG é produzida preferencialmente em relação a IgM, (TIZARD, 2002).

Para a IgM houve diferença significativa entre os grupos sendo que o grupo das vacas não vacinadas apresentaram, em média, os maiores valores. SILVA (2004) também encontrou níveis significativamente mais altos de IgM no soro sanguíneo das vacas não vacinadas.

Para a IgA houve diferença significativa entre os grupos, sendo os maiores valores encontrados nas vacas não vacinadas. Estes dados são contrários aos encontrados por FERNANDEZ et al. (1996) que verificaram aumento de todas as classes de imunoglobulinas nas vacas vacinadas com três vacinas distintas (VLP, CLP e vacina produzida com a estirpe SA11, inativada e formulada com adjuvante incompleto de Freund).

Os níveis séricos de IgM e IgA aumentados nas vacas do grupo controle pode ser um forte indicativo da circulação viral nesta propriedade. O aumento destas imunoglobulinas também foi verificado por VAN ZAANE et al. (1986) SAIF (1987) e FERNANDEZ et al. (1998) após desafio com rotavírus em bezerros.

Em relação aos momentos os níveis de IgG, IgM e IgA não diferiram significativamente.

Os níveis de IgG1 no dia do parto foram significativamente menores do que no dia D-30. Este achado corrobora com a literatura, pois esta é a principal imunoglobulina do colostro e leite e é transferida seletivamente da corrente sanguínea para a glândula mamária (TIZARD, 2002).

Os níveis de IgG2 foram significativamente menores no dia D-60 em relação aos dias D-30 e dia do parto.

Observou-se neste estudo uma predominância sérica da classe IgM, seguida pelas classes IgG e subclasse IgG1. As imunoglobulinas da classe IgA e subclasse IgG2 apresentaram os níveis mais baixos. Estes dados estão de acordo com SILVA (2004), entretanto discordam de FERNANDEZ et al. (1996) que encontraram predominância da subclasse IgG2 após a vacinação com as vacinas VLP, CLP e SA11 inativada.

Verificou-se neste estudo um aumento médio dos níveis de todas as imunoglobulinas no dia da revacinação, ou seja, 30 dias após a primovacinação, e um declínio nos níveis destas imunoglobulinas no dia do parto.

Estes dados diferem de SNODGRASS et al. (1980) que encontraram níveis séricos de anticorpos neutralizantes significativamente aumentados em novilhas vacinadas com vacina inativada pelo formol e adjuvada com adjuvante incompleto de Freund, com a média de títulos variando de 63 no dia da vacinação a um pico de 11.910 um mês após a vacinação. Estes títulos se mantiveram altos durante toda a gestação e estavam em 3.929 após a revacinação, que ocorreu 7 meses após. Nove meses após a primovacinação, o título médio foi de 3.092 nas vacas vacinadas e 74 das vacas não vacinadas. KOHARA et al. (1997) também encontraram anticorpos neutralizantes séricos aumentados em vacas vacinadas com uma vacina comercial, que continha o rotavírus inativado, em relação às vacas não vacinadas. SAIF et al. (1984) encontraram que níveis séricos de anticorpos em vacas vacinadas com uma vacina viva modificada comercial não

diferiram significativamente de vacas não vacinadas, concordando com os dados encontrados neste trabalho.

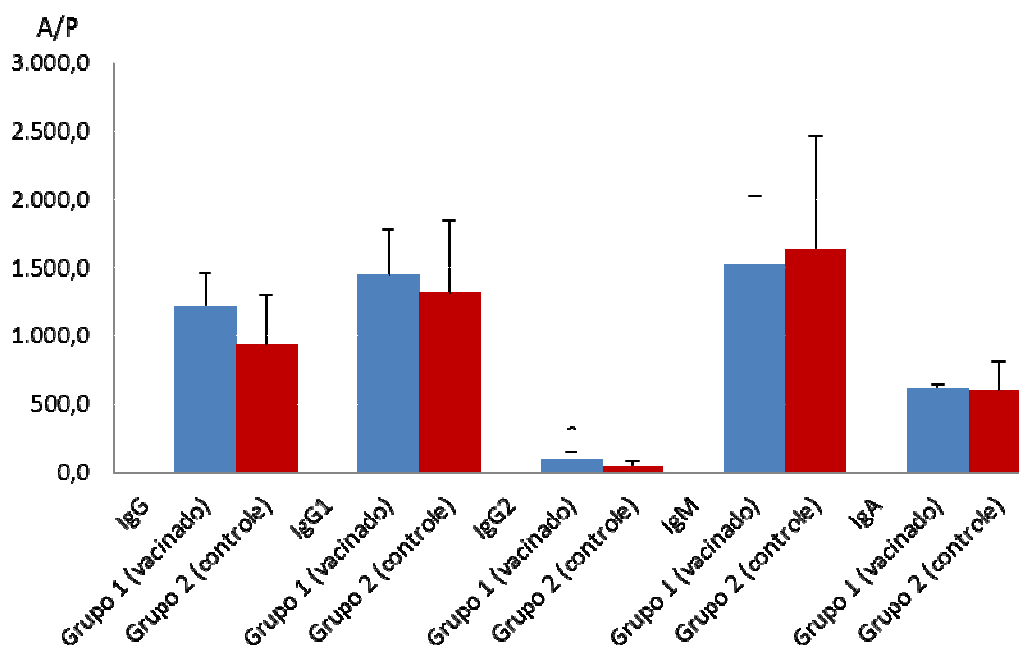
5.2 Níveis colostrais de imunoglobulinas anti-rotavírus em vacas vacinadas e não vacinadas, antes da vacinação (D-60), da revacinação (D-30) e no dia do parto (D0)

Os níveis colostrais médios das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2, IgM e IgA anti-rotavírus em valores de A/P corrigido pela diluição no colostro foram determinados por ELISA indireto conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 4: Níveis médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensuradas por ELISA indireto, no colostro de vacas vacinadas e não vacinadas, no dia do parto.

Imunoglobulina e Grupo	Tempo D0	
IgG		
Grupo 1 (vacinado)	1.218,2 ±	245,0
Grupo 2 (controle)	937,7 ±	362,1
IgG1		
Grupo 1 (vacinado)	1.450,0 ±	340,6
Grupo 2 (controle)	1.312,6 ±	541,0
IgG2		
Grupo 1 (vacinado)*	99,8 ±	51,4
Grupo 2 (controle)	50,5 ±	32,3
IgM		
Grupo 1 (vacinado)	1.523,1 ±	510,5
Grupo 2 (controle)	1.637,0 ±	837,9
IgA		
Grupo 1 (vacinado)	616,2 ±	32,3
Grupo 2 (controle)	603,5 ±	215,1

* $p < 0,05$ pelo teste de Tukey



* $p < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Figura 4: Níveis médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensuradas por ELISA indireto, no colostro de vacas vacinadas e não vacinadas, no dia do parto.

Não houveram diferenças estatísticas significativas para as imunoglobulinas das classes IgG, IgG1, IgM e IgA mensuradas no colostro das vacas vacinadas e não vacinadas no dia do parto mas os níveis de IgG2 foram significativamente maiores no colostro das vacas vacinadas.

Apesar de não haver diferença estatística, os níveis de IgG1 foram maiores nas vacas vacinadas, e os níveis de IgM foram maiores nas vacas não vacinadas, o que condiz com os níveis séricos de IgG1 significativamente aumentados nas vacas vacinadas e IgM significativamente aumentados nas vacas não vacinadas, já que estas imunoglobulinas são transferidas do sangue para o colostro (TIZARD, 2008). Os níveis de IgA foram maiores nas vacas vacinadas, apesar de estarem significativamente aumentados no soro das vacas não vacinadas. Este achado

pode ser correlacionado com o fato de esta imunoglobulina também ser sintetizada no tecido mamário além de ser transferida para o colostro através do sangue materno (TIZARD, 2008).

SAIF et al. (1983) também não encontraram diferenças nos níveis de anticorpos colostrais em animais vacinados com vacina comercial e animais não vacinados, mas encontraram níveis colostrais aumentados de IgG1 em vacas vacinadas com uma vacina experimental. Estes dados diferem dos autores SNODGRASS et al. (1980) que encontraram níveis colostrais de IgG1 e IgA significativamente aumentados em novilhas vacinadas e FERNANDEZ et al. (1996) que encontraram todas as imunoglobulinas aumentadas no colostro de vacas vacinadas com a vacina CLP e as imunoglobulinas IgG1, IgA e IgM aumentadas em vacas vacinadas com vacina VLP e inativada, apesar dos níveis desta última serem inferiores aos demais. KOHARA et al. (1997) encontraram níveis de anticorpos neutralizantes significativamente aumentados no colostro de vacas vacinadas com vacina comercial, e no Brasil, SILVA et al. (2008) também encontraram níveis de IgG, IgG1 e IgG2 significativamente aumentados no colostro de vacas vacinadas com vacina inativada comercial.

5.3 Níveis séricos de imunoglobulinas anti-rotavírus em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas que mamaram seus respectivos colostros

Os níveis séricos médios das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2, IgM, e IgA anti-rotavírus em valores de A/P corrigido pela diluição dos soros foram determinados no dia do nascimento, antes da mamada do colostro, e 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o nascimento em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas que receberam colostros de suas respectivas mães no dia do nascimento estão relacionados na tabela 4.

Tabela 5: Níveis séricos médios de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto em bezerros, no dia do nascimento e 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o nascimento.

Imunoglobulina e Grupo	Tempo					
	D0	D1	D7	D14	D21	D28
IgG						
G1 (vacinado)	1,0±1,8	148,6±91,1	146,2±47,9	134,9±63,8	127,5±55,9	112,7±55,3
G2 (controle)	0,0±0,1	185±43,5	152,1±48,3	132,7±33,7	116,2±36,9	98,7±40,3
IgG1						
G1 (vacinado)	4,8±6,1	138,4±71,5	139,5±61,0	143,6±59,1	142,0±55,5	197,8±98,0
G2 (controle)	2,9±3,2	155,2±32,3	160,3±29,2	159,8±35,6	153,4±31,8	143,3±40,2
IgG2						
G1 (vacinado)	4,2±5,7	18,4±14,8	11,0±5,5	5,5±3,3	5,1±3,7	7,6±5,7
G2 (controle)	2,8±2,1	15,1±6,2	10,2±3,7	7,0±5,8	9,2±8,3	8,6±7,4
IgM						
G1 (vacinado)	8,1±7,5	190,4±129,1	142,0±163,0	33,8±11,6	96,7±89,6	58,0±47,1
G2 (controle)	0,4±0,9	329,7±111,9	101,7±67,0	30,7±19,9	27,7±24,0	49,8±45,3
IgA						
G1 (vacinado)	4,7±8,7	21,0±9,5	19,4±5,6	15,3±5,6	19,1±6,7	17,6±6,6
G2 (controle)	2,2±2,6	25,9±1,4	22,6±3,9	14,6±5,0	14,8±3,1	17,3±8,8

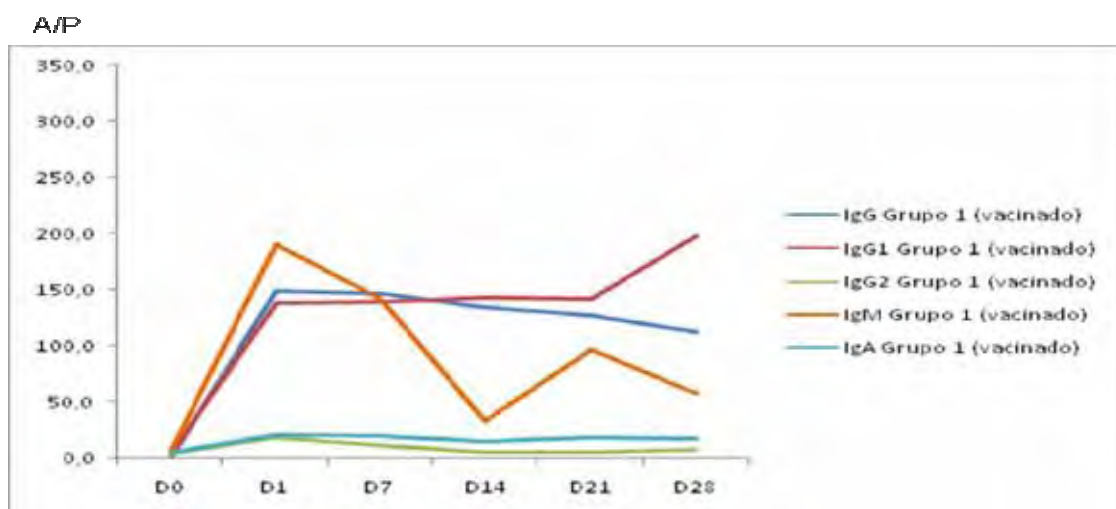


Figura 5. Níveis séricos médios (A/P) de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.

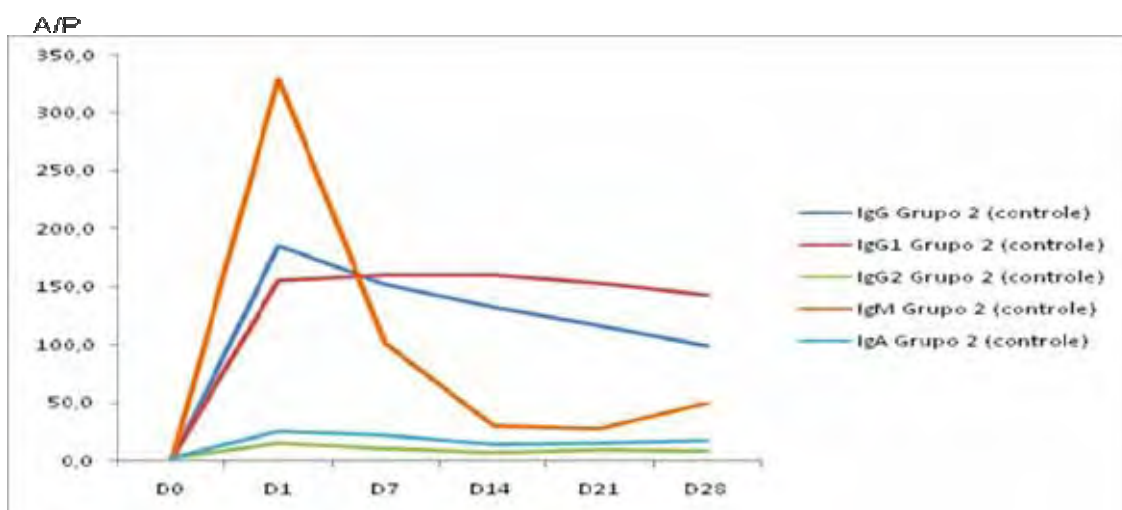
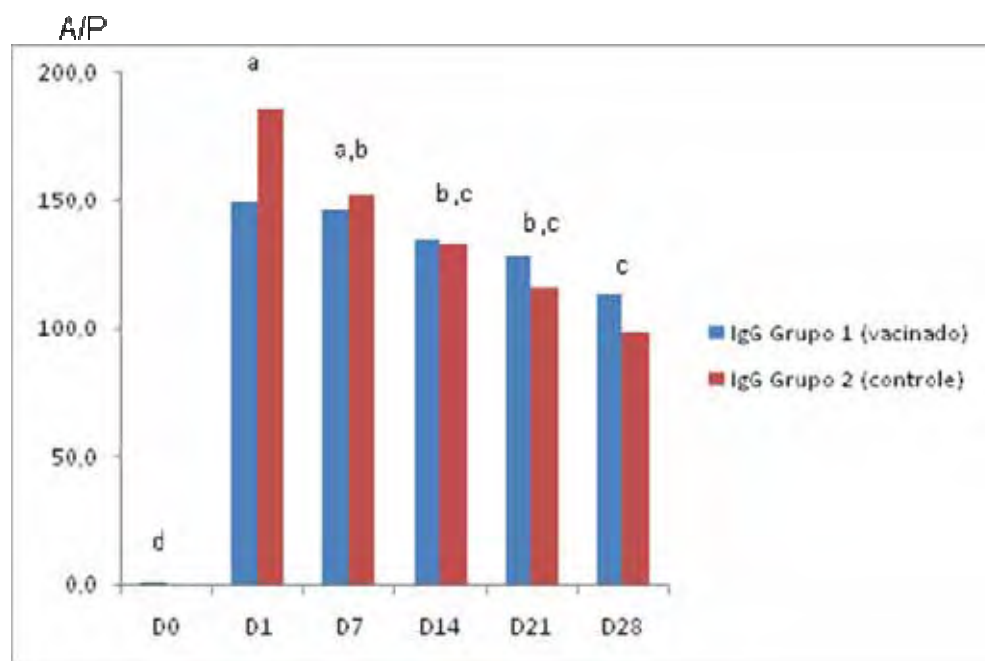


Figura 6: Níveis séricos médios (A/P) de imunoglobulinas anti-rotavírus, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas não vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.

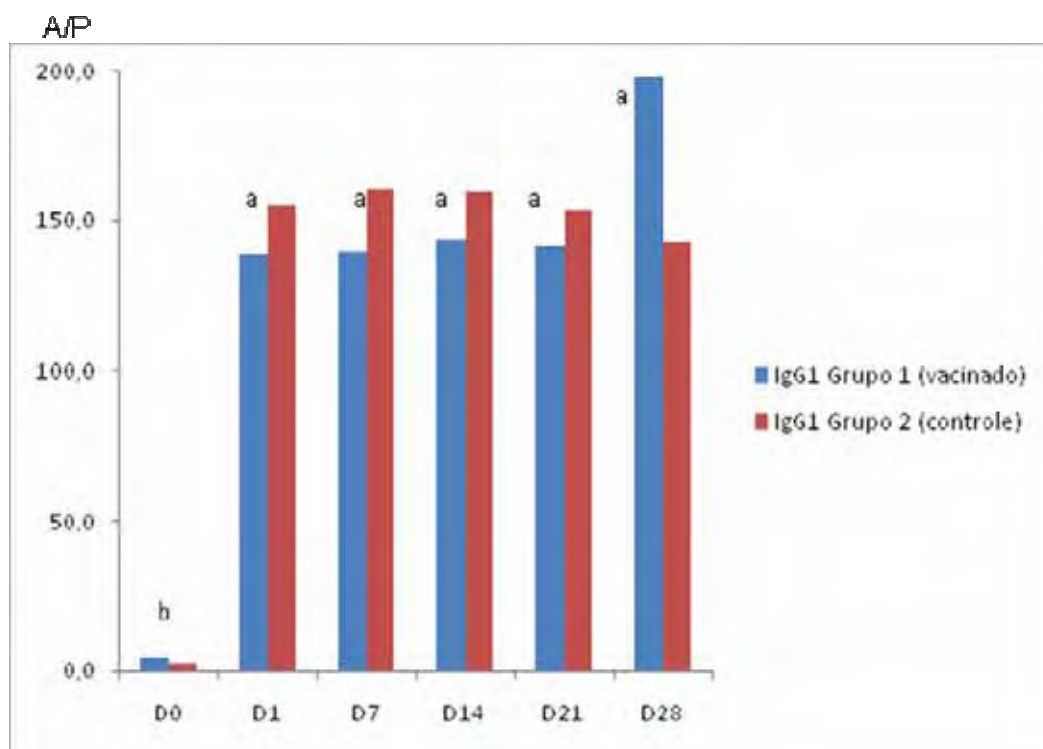
Para a imunoglobulina IgG não houve diferença estatística entre os grupos. O dia do nascimento diferiu significativamente dos outros, tendo os menores níveis.



Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$.

Figura 7. Níveis séricos médios (A/P) de IgG, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas, no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.

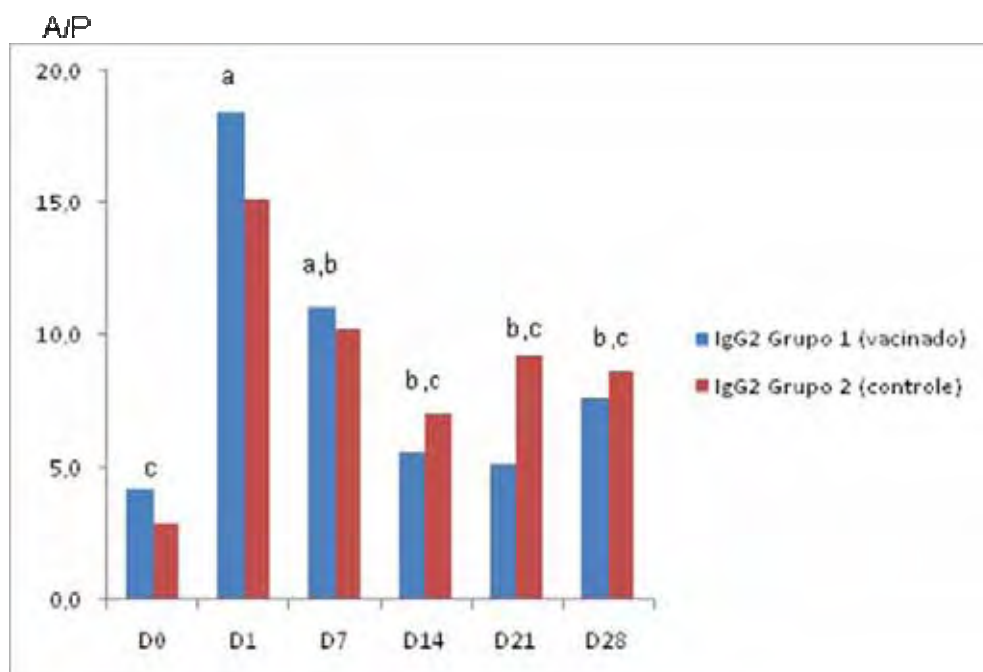
Para a imunoglobulina IgG1 dos bezerros, no dia do nascimento, os valores séricos médios foram estatisticamente menores do que os momentos seguintes, entretanto não foram encontradas diferenças entre grupos.



Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0.05$.

Figura 8: Níveis séricos médios (A/P) de IgG1, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas, no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14, 21 e 28 dias após o nascimento.

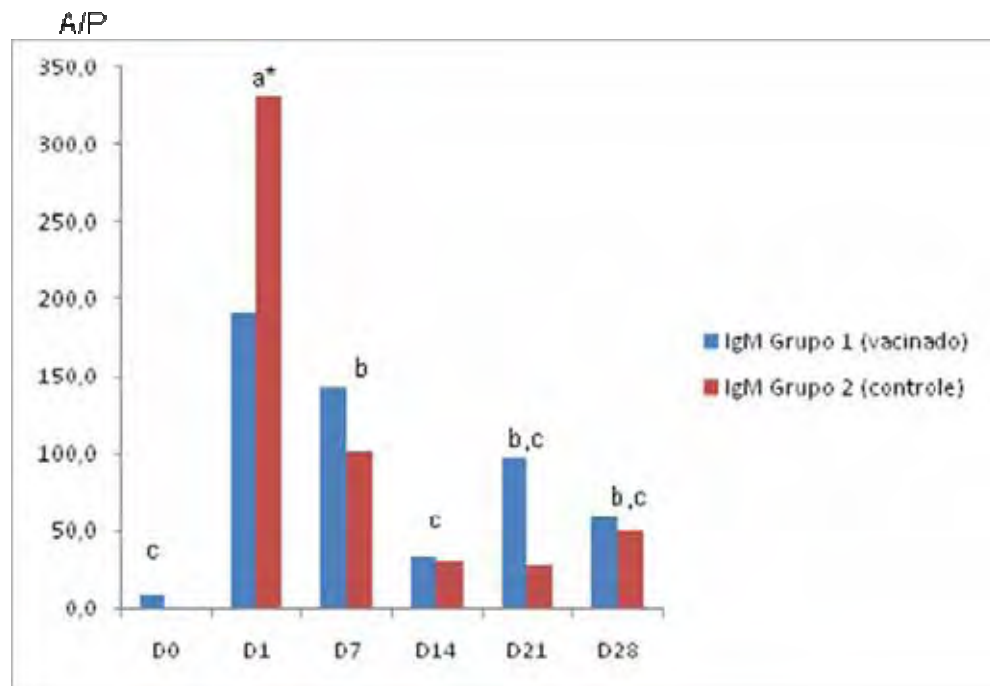
Para a imunoglobulina IgG2 não houve diferença significativa entre os grupos. O primeiro dia após o nascimento diferiu significativamente dos momentos 0, 14, 21 e 28.



Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0.05$.

Figura 9. Níveis séricos médios (A/P) de IgG2, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.

Para a imunoglobulina IgM, houve diferença significativa da interação grupo/ momento no primeiro dia após o nascimento, sendo que os valores encontrados no grupo de bezerros filhos de vacas não vacinadas foram significativamente maiores. Entre momentos, o primeiro dia após o nascimento foi significativamente maior do que todos os outros momentos.

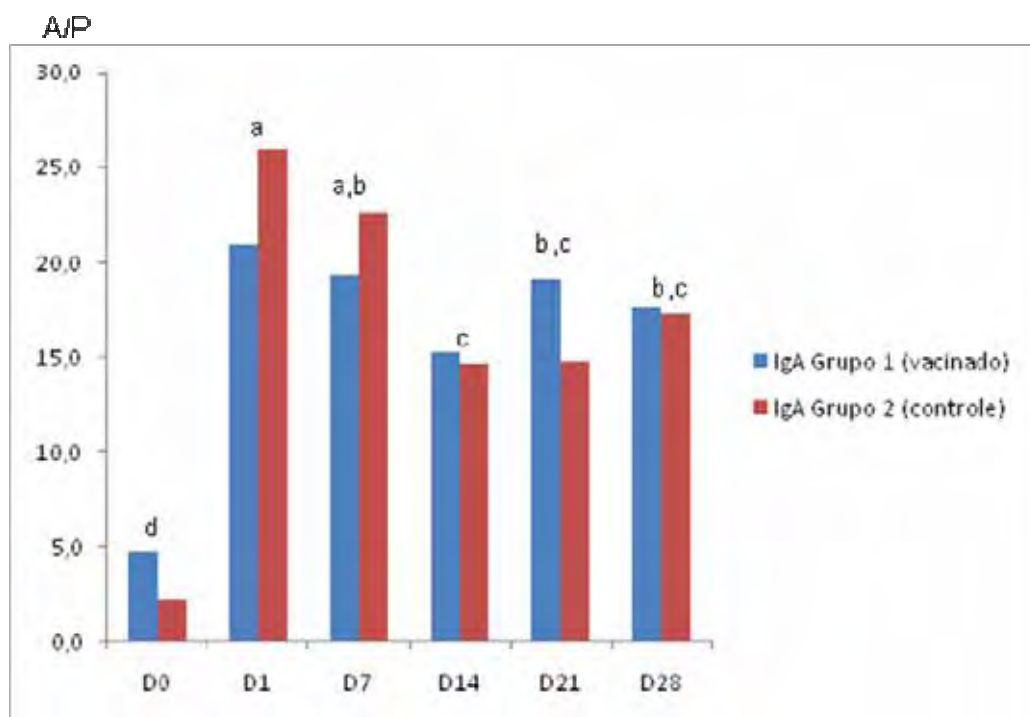


Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0.05$.

* diferença estatisticamente significativa da interação grupo*momento

Figura 10. Níveis séricos médios (A/P) de IgM, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.

Para a imunoglobulina IgA houve diferença estatística entre os momentos sendo que o D0 teve os menores valores.



Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey $p < 0,05$

Figura 11: Níveis séricos médios (A/P) de IgA, mensurados por ELISA indireto, em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas no dia do nascimento (antes de mamar o colostro) e 1, 7, 14 21 e 28 dias após o nascimento.

A análise do soro sangüíneo dos bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas revelou aumento significativo para todas as imunoglobulinas entre o dia do nascimento (D0) e o primeiro dia de vida (D1), o que era de se esperar, pelo fato dos bezerros nascerem agamaglobulêmicos (SAIF & FERNANDES, 1996).

Apesar de não haver diferenças significativas das imunoglobulinas séricas entre os grupos de bezerros, houve diferença significativa da interação grupo/momento para a IgM. No primeiro dia após o nascimento esta imunoglobulina estava significativamente aumentada no grupo dos bezerros nascidos de vacas não vacinadas. Neste estudo, os níveis de IgM estavam superiores, embora não significativo, no colostro das vacas não vacinadas, e

significativamente aumentados no sangue destas vacas. Níveis aumentados de imunoglobulinas no sangue e colostro de vacas refletindo em aumento dos níveis séricos em bezerros também foram descritos por FERNANDEZ et al. (1998) embora os mecanismos de transporte de imunoglobulina através do epitélio intestinal ter sido comprovado apenas para a IgG1.

Apesar dos níveis séricos de IgG1 estarem significativamente aumentados no grupo das vacas vacinadas esta diferença significativa não foi encontrada no colostro destas vacas e nem no sangue dos bezerros nascidos das mesmas ao primeiro dia de vida. FERNANDEZ et al. (1998) encontraram níveis séricos aumentados de IgG1 nos bezerros alimentados com colostro de vacas vacinadas com a vacina VLP e CLP e níveis de IgA aumentados nos bezerros alimentados com o colostro das vacas vacinadas com a vacina VLP. SILVA (2004) não encontrou diferenças das imunoglobulinas IgG, IgG1, IgA e IgM no soro dos bezerros, sendo que a IgG2 foi estatisticamente superior no grupo dos bezerros nascidos das vacas vacinadas até os 14 dias de idade.

Ao longo do período avaliado, as imunoglobulinas tiveram um declínio gradativo, entretanto houve um aumento dos níveis de IgM nos bezerros filhos de vacas vacinadas aos 21 dias (Figura 10). FERNANDES et al. (1996) também verificaram aumento de IgM nos grupo de bezerros que não receberam colostro ou receberam colostro controle 7 dias após o desafio, indicando que a resposta ativa nos bezerros que foram alimentados com colostro de vacas vacinadas foi de menor magnitude, desenvolvida posteriormente e, quando presente, associada principalmente à IgM, dados consistentes com a supressão da resposta ativa pelos anticorpos maternos.

No dia D21 foi encontrada excreção viral de rotavírus em um bezerro nascido de vaca vacinada, entretanto, os níveis de imunoglobulinas deste animal não foram diferentes dos níveis observados nos outros bezerros do grupo nesta data, não podendo assim atribuir o aumento dos níveis de IgM unicamente a este bezerro.

5.4 Excreção de rotavírus em bezerros nascidos de vacas vacinada e não vacinadas

O rotavírus bovino do grupo A foi detectado em três amostras de fezes (2,63%) através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, sendo uma amostra de bezerro nascido de vaca vacinada (1/52 ou 1,92%) e 2 amostras de bezerros nascidos de vacas não vacinadas (2/58 ou 3,45%). KOHARA et al. (1997) encontraram detecção de rotavírus em 7,8% de bezerros nascidos de vacas vacinadas com vacina comercial e 17,4% em bezerros nascidos de vacas não vacinadas. Já SILVA (2004) encontrou uma prevalência de 9,9% nos bezerros nascidos de vacas vacinadas e 2,2% em bezerros nascidos de vacas não vacinadas.

Pelo teste exato de Fischer não houve associação entre a presença do rotavírus nas fezes de bezerros nascidos de vacas vacinadas ou não vacinadas. Uma das amostras positivas foi detectada em fezes de consistência pastosa (não diarréica) de um bezerro, filho da vaca vacinada aos 21 dias após o nascimento (D21), as outras duas amostras positivas foram detectadas em bezerros filhos de vacas não vacinadas, sendo uma no sétimo (D7) dia pós nascimento, de consistência pastosa (não diarréica), porém, com coloração esbranquiçada e a outra detectada no D14, sendo a única diarréica.

SNODGRASS et al. (1980) verificaram que bezerros nascidos e alimentados com colostro de vacas vacinadas tiveram um atraso no período de incubação e pré-patente em bezerros nascidos de novilhas vacinadas, quando desafiados. Já FERNANDEZ et al. (1998) mostraram que a vacinação de vacas com vacinas VLP e CLP diminuiu a severidade da diarréia mas houve excreção viral pós inoculação em todos os grupos. GONZALEZ et al. (2010) também verificaram que bezerros alimentados com colostro com altos níveis de anticorpos

tiveram atraso e redução da diarreia e excreção viral em comparação aos bezerros controles.

Apesar da baixa prevalência de rotavírus detectadas neste estudo (apenas 3 bezerros) esta detecção foi mais tardia (aos 21 dias) no bezerro nascido de vaca vacinada. Nos dois bezerros nascidos de vacas não vacinados a excreção foi aos 7 e 14 dias pós nascimento. Este fato pode ser explicado pelo bom manejo da propriedade e vacinações repetidas contra a diarreia neonatal bovina nas vacas, já que as infecções virais tendem a ser mais brandas quando ocorre uma interação ao longo do tempo entre os vírus e seus hospedeiros (TIZARD, 2008).

Dos autores que avaliaram vacinas comerciais em condições de campo KOHARA et al. (1997) verificaram que a morbidade da diarreia foi de 56,9% e 50% em bezerros nascidos de vacas vacinadas e não vacinadas respectivamente, e não encontraram diferenças entre o início e a duração da diarreia em bezerros nascidos de vacas vacinadas ou controle. MOHAMMADI et al. (2004) também verificaram que a vacinação de vacas não ajudou na redução da incidência da diarreia neonatal bovina. No Brasil, SILVA (2004) encontrou excreção viral no sétimo dia em bezerros nascidos de vacas não vacinadas e aos 14 dias em bezerros filhos de vacas vacinadas, corroborando com os dados deste estudo de que a vacinação materna no terço final da gestação, não evitou a excreção viral de rotavírus nas fezes dos bezerros.

6. CONCLUSÕES

O uso da vacina comercial inativada contra rotavírus no terço final de gestação em um rebanho leiteiro mostrou que:

- A circulação viral esteve mais evidente nas vacas não vacinadas, porque estas apresentaram níveis séricos maiores da imunoglobulina IgM, que é a principal imunoglobulina em uma resposta imune primária.

- A vacinação melhorou a imunidade e as taxas de IgG1 das vacas diante de um rebanho que teve circulação do rotavírus.

- Os níveis de IgG2 do colostro foram aumentados pela vacinação antes do parto.

- As taxas de qualquer das imunoglobulinas séricas dos bezerros não foram aumentadas pela ingestão do colostro de vacas vacinadas

- O aumento postergado de IgM sérico nos bezerros nascidos das vacas vacinadas indicou que a vacinação atrasou mas não evitou a ocorrência da rotavirose na prole.

- Ocorreu excreção viral mais precoce nos bezerros das vacas não vacinadas (idade de 7 e 14 dias) e mais tardia no bezerro da vaca vacinada (idade de 21 dias).

7. REFERÊNCIAS

ABE, M. et al. Whole genome characterization of new bovine rotavírus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. **Journal of General Virology**, Berks, v. 92, p. 952–960, 2011.

ACRES, S.D.; RADOSTITS, O. M. The efficacy of a modified live reo-like virus vaccine and an *E. coli* bacterin for prevention of acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves. **The Canadian Veterinary Journal La Revue Veterinaire Canadienne**, v. 17; n. 8; p. 197-212, 1976.

ALFIERI, A. A. et al. Aspectos epidemiológicos da rotavírose suína na região sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Seminário: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 20; n. 1, p. 5-11, mar, 1999.

ALFIERI, A. F. et al. G and P genotypes of group A rotavírus strains circulating in calves in Brazil, 1996–1999. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 99, p.167–173, 2004.

ALFIERI, A. A. et al. Frequency of group A rotavírus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**, Dordrecht, v. 38, p. 521–526, 2006.

BARBOSA, E. F. et al. Rotavírus do grupo A em bezerros lactentes no Estado de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, jul-set, 1998.

BESSER, T. E. et al. Passive immunity to bovine rotavírus infection associated with transfer of serum antibody into the intestinal lumen. **Journal of Virology**, Washington, v. 62, n. 7, p. 2238-2242, 1988.

BOTTEON, R. C. C. M. et al. Frequência de diarreia em bezerros mestiços sob diferentes condições de manejo na região do médio Paraíba Rio de Janeiro e Minas Gerais. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 153-160, 2008.

BRANDÃO, P. E. et al. Ocorrência de anticorpos anti-rotavírus em bovinos no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 115-116, 2002.

BRIDGER, J. C. A definition of bovine rotavirus virulence. **Journal of General Virology**, Berks, n, 75 p. 2807-2812, 1994.

BRITO, W. M. E. D. et al. Characterization of mixed infectious with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 31, p. 140-145, 2000.

BUZINARO, M.G. et al. Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte; v. 52, n. 6, p. 555-561, 2000.

BUZINARO, M. G; FREITAS, P. P. Rotavírus do grupo A em rebanhos bovinos leiteiros da região nordeste do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 23-26, out-dez, 2002.

CARUZO, T. A. R. et al. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 8, p. 1040-1043, 2010.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavírus gene structure and function. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 53, n. 4, p. 410-449, 1989.

ESTES, M. K. Rotaviruses In: FIELDS, B. N. et al. **Fields Virology**, Lippincott-Raven, Philadelphia/New York, v.2, 3 ed, p.1657-1708, 1996.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication In: FIELDS, B. N. et al. **Fields Virology**, Lippincott-Raven Philadelphia/New York, v.2, 4 ed, p. 1747-1785, 2001.

FERNANDEZ, F. M. et. al. Isotype-specific antibody responses to rotavirus and virus proteins in cows inoculated with subunit vaccines composed of recombinant SA11 rotavírus core-like particles (CLP) or virus-like particles (VLP). **Vaccine**, Oxford, v. 14, p. 1303-1312, 1996.

FERNANDEZ, F. M. et al. Passive immunity in newborn calves supplements from with recombinant to bovine rotavírus fed colostrums cows immunized SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. **Vaccine**, Oxford, v. 16, n. 5, p. 507-516, 1998.

FOSTER, D. M.; SMITH, G. W. Pathophysiology of diarrhea in Calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Maryland Heights v. 25, p. 13–36, 2009.

FREITAS, P. P. S. et al. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 4, p. 820-827, 2011.

GONZALES, D. D. et al. Evaluation of a bovine rotavírus VP6 vaccine efficacy in the calf model of infection and disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 137, n.1-2, p. 155–160, 2010.

GREGORY, F. **Diarréia neonatal: desenvolvimento e avaliação de um método de ELISA para detecção de rotavírus a partir de material fecal**. Dissertação. Mestrado em medicina veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1999.

HERRING, A. J. et al. Rapid diagnosis of rotavírus infection by direct deection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.16, n. 3, p. 473-477, 1982.

HOSHINO & KAPIKIAN. Rotavirus Serotypes: Classification and Importance in Epidemiology, Immunity, and Vaccine Development. **Journal of Health Population and Nutrition**, Dhaka, n, 18, v, 1 p 5-14, 2011.

IZZO, M. M. et al. Comparison of three diagnostic techniques for detection of rotavírus and coronavirus in calf faeces in Australia. **Australian Veterinary Journal**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 122-129, 2012.

JEREZ J. A et al. Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarréicas de bezerros. **Revista de Microbiologia**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 3, p. 201-204, jul.-set. 1987.

JEREZ, J. A. et al. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarréia criados em vários municípios do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p.19-23, abr.-jun. 2002.

KILLINGTON, R. A.; STOKES, A.; HIERHOLZER, J. C. PEG Precipitation. In: MAHY, B. W. J; O KANGRO, H. **Virology methods manual**. San Diego: Academic Press, p. 73-74, 1996.

KIM, Y. et al. Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinant bovine rotavirus-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. **Vaccine**, Oxford, v. 20, p. 1248–1258, 2002.

KOHARA, J. et al. Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea. **Journal of Veterinary Medical Science**, Tokyo, v. 59, n.11, p. 1023-1025, 1997.

KOOPMANS, M; DUIZER, E. Foodborne viruses: an emerging problem. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, p. 23–41, 2004.

LIU, D.; HANSON, L.A.; PINCHUK, L. **Rotaviruses**. In: Molecular Detection of Foodborne Pathogens. Ed. Dongyou Liu, Taylor and Francis Group, New South Wales, p. 91-98, 2010.

LUCHELLI, A. et al. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 53, n.2, p.169-74, 1992.

MATTHIJNSSENS, J et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, Vienna, n. 156 v, 8 p. 1397-1413, 2011.

MOHAMMADI, G. R. et al. **Field trial evaluation of kolbin RC(Rotavírus/Coronavirus/Escherichia coli) vaccine for prevention of neonatal calf diarrhea in dairy herd.** In: International Conference of the Associations of Institutions for Tropical Veterinary Medicines and 16 th veterinary Association Malaysia Congress 23-27 August 2004, Sunway Pyramid Convention Centre Petaling Jaya. p. 270-272.

PARREÑO, V. et al. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavírus in calves experimentally challenged with bovine rotavírus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 100, p. 7–24, 2004.

PEREIRA, H. G. et al. Eletrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo e Pará, Brazil. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, Jena, v. 80, p. 117-25, 1983.

PETRIE, A., WATSON, P. Statistics for veterinary and animal science. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2006.

SAIF, L. J. et al. Passive immunity to bovine rotavírus in newborn calves fed colostrum supplements from immunized or nonimmunized cows. **Infection and Immunity**, Washington, v.41, p. 1118-1131, 1983.

SAIF, L. J.; FERNANDEZ, F. M. Group a rotavírus veterinary vaccines. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 174, n. 1, p. S98-S106, 1996.

SAIF, L. J. et al. Immune response of pregnant cows to bovine rotavírus immunization. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 45, p. 49-58, 1984.

SALLES, R. **Caracterização molecular de estirpes de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros e de corte das regiões nordeste e centro-oeste no Estado de São Paulo**. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, fev. 2009.

SILVA, D. G. **Monitoramento da imunidade passiva em bezerros alimentados com colostro de vacas imunizadas e não imunizadas com vacina inativada contra rotavírus**. 2004. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, fev. 2004.

SILVA, D. G. et al. Avaliação da imunidade passiva em bezerros nascidos de vacas imunizadas com vacina contra rotavírus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, p. 1089-1096, 2008.

SNODGRASS, D. R.; FAHEY, K. J.; WELLS, P. W. Passive immunity in calf rotavírus infections: maternal vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion in milk. **Infection and Immunity**, v. 28, n.2, p. 344-349, 1980.

SNODGRASS, D. R. et al. Bovine rotavirus serotypes and their significance for immunization. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 20, n.3, p. 342-346, 1984.

SNODGRASS, D. R. et al. Rotavírus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.28, n.3, p. 504-507, mar. 1990.

TANG, B. et al. Comparison of the rotavírus gene 6 from different species by sequence analysis and localization of subgroup-specific epitopes using site-directed mutagenesis. **Virology**, Maryland Heights, v. 237, p. 89-96, 1997.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária uma introdução**. 6 ed. São Paulo: Rocca, 2002, p. 223-246.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária uma introdução**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008 p. 166-167, 175-184, 236-239, 253-258, 307-310.

VAN ZAANE, D et al. Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrums with or without rotavirus antibody. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam v. 11, p. 45—63, 1996.

WOODE, G. N. et al. Protection between different serotypes of bovine rotavirus in gnotobiotic calves: specificity of serum antibody and coproantibody responses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.25, n. 6, p. 1052-1058, jun. 1987.