

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES DE
ROTAVÍRUS EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS E DE
CORTE DAS REGIÕES NORDESTE E CENTRO OESTE NO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Roberta de Salles

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2009

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

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES DE
ROTAVÍRUS EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS E DE
CORTE DAS REGIÕES NORDESTE E CENTRO-OESTE NO
ESTADO DE SÃO PAULO**

Roberta de Salles

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 – SP

Fevereiro – 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ROBERTA DE SALLES – nascida em 20 de abril de 1982, no município de Santos – SP, filha de Roberto de Salles e Mônica Maria Souza de Salles. Ingressou em fevereiro de 2002 no Curso de Medicina Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade de Marília (Unimar), concluindo-o em dezembro de 2006. Em março de 2007 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 fevereiro de 2009.

Aos meus pais Roberto e Mônica, que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade, pelo amor incondicional que vocês têm por mim e por terem lutado ao meu lado.

Aos meus avós Dirceu e Ignês, pelo carinho e fé, vocês sempre acreditaram no meu sucesso.

A vocês dedico

Aos meus irmãos: Renato (*in memoriam*), que sempre estará presente em minha memória e vivo no meu coração; Marcelo, pela amizade e cumplicidade; Maria Luiza, que mesmo à distância, faz parte da minha história.

Ofereço

Agradeço:

A Deus, por iluminar o meu caminho e permanecer ao meu lado.

Aos meus tios e tias, primos e primas, que fazem com que minha família seja algo espetacular.

Ao meu namorado Rogério, que sempre me apoiou e me incentivou a correr atrás dos meus sonhos. Amo você!

A orientadora Prof^a. Dr^a. Maria da Glória Buzinaro, pela orientação durante o desenvolvimento desse trabalho. Glorinha, agradeço a amizade, confiança e incentivo durante esses anos. Você é muito especial.

Aos professores do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Jaboticabal.

A Prof^a. Dr^a. Adolorata, pela amizade e incentivo. Você é um exemplo a seguir.

Ao Prof. Dr. Samir, pela amizade, colaboração e sugestões feitas na qualificação e defesa dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Amaral, pelas sábias palavras, que muitas vezes me acalmaram.

Ao Prof. Dr. Mathias pelo incentivo e sugestões feitas na qualificação dessa dissertação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Moro, que nunca negou ajuda, pelo apoio e sugestões feitas na defesa dessa dissertação

Aos pós-graduandos e estagiários do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Jaboticabal, em especial Viviane e Ingrid que dividiram comigo o apartamento e um pouquinho de suas vidas, pelos conselhos e longas conversas jogadas fora. A Lizzy pela amizade e ajuda na realização desse trabalho. A Bruna e Mônica, pela amizade, sempre dispostas a me ajudar e compartilhar seus conhecimentos.

A todos os funcionários do departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Jaboticabal, pelas conversas e risadas, de alguma forma todos vocês colaboraram para que esse trabalho fosse realizado.

A todos os meus amigos, a família que Deus me permitiu escolher. A todos vocês: obrigada!

Aos animais, seres Divinos, os quais devo minha dedicação.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Considerações gerais.....	1
1.2 Patogenia da infecção por rotavírus e métodos de diagnóstico....	4
1.3 Ocorrência de rotavírus em rebanhos bovinos no exterior.....	5
1.4 Ocorrência de rotavírus bovino em rebanhos no Brasil.....	7
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Obtenção das amostras de fezes.....	12
3.2 Análise da presença de rotavírus nas fezes por meio da EGPA...	14
3.2.1 Preparo da suspensão fecal.....	14
3.2.2 Extração do ácido nucléico viral.....	14
3.2.3 Preparo do gel de poliacrilamida.....	15
3.2.4 Coloração do gel.....	15
3.2.5 Fotografia do gel	16
3.3 Amostra padrão de rotavírus.....	16
3.4 Genotipagem das amostras positivas.....	17
3.4.1 Extração do RNA dupla fita (dsRNA) de rotavírus bovino	17

3.4.2 Síntese de cDNA e Reação da Polimerase em Cadeia....	18
3.4.3 <i>Semi-nested</i> multiplex PCR	19
3.5 Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Triagem das amostras de fezes de bezerros pela EGPA.....	22
4.2 Análise do perfil eletroforético do genoma de rotavírus pela técnica de EGPA.....	26
4.3 Classificação das amostras virais pela RT- <i>snm</i> PCR.....	28
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Seqüência dos iniciadores e sua localização no genoma dos rotavírus, bem como o comprimento do segmento amplificado....	20
Tabela 2.	Resultados da EGPA aplicada em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, em rebanhos leiteiros e de corte das regiões Nordeste e Centro-Oeste do Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 e setembro de 2008.....	22
Tabela 3.	Resultados da EGPA para a detecção de rotavírus do grupo A em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, separados pelo tipo de exploração do rebanho, nas regiões Nordeste e Centro-Oeste no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 e setembro de 2008.....	23
Tabela 4.	Resultados da EGPA para a detecção de rotavírus do grupo A em amostras de fezes de bezerros de rebanhos de corte, na faixa etária de 1 a 60 dias, segundo a consistência das fezes, nas regiões Nordeste e Centro-Oeste no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 e setembro de 2008.....	24
Tabela 5.	Resultados da EGPA para detecção de rotavírus do grupo A em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, em rebanhos leiteiros das regiões Nordeste e Centro-Oeste do Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 a setembro de 2008.....	25
Tabela 6.	Resultado das amostras positivas para rotavírus do grupo A pela EGPA, segundo a divisão de faixa etária com intervalo de 15 dias e a manifestação ou não de diarreia, nos rebanhos analisados das regiões Nordeste e Centro-Oeste no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 a setembro de 2008.....	26

Tabela 7.	Tipos eletroforéticos de rotavírus distribuídos, segundo os municípios e os rebanhos de origem, de alguns municípios no Estado de São Paulo, no período de julho de 2006 a setembro de 2008.....	28
Tabela 8.	Resultado da genotipagem das amostras positivas para rotavírus do grupo A pela RT seguida de semi-nested multiplex PCR (RT- <i>snm</i> PCR), em rebanhos bovinos leiteiros e de corte de municípios no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 a setembro de 2008.....	29
Tabela 9.	Resultado da eletroferotipagem e genotipagem das amostras positivas para rotavírus do grupo A pela RT- <i>snm</i> PCR, segundo o rebanho de origem, em municípios no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 a setembro de 2008.....	30

LISTA DE FIGURAS

- Figura .1** Mapa do Estado de São Paulo destacando os municípios onde estão localizados os rebanhos estudados, no período de julho de 2006 a setembro de 2008..... 13
- Figura 2.** Perfil eletroforético do genoma de rotavírus do grupo A da amostra BO/R^{*}51/08 (1) eletroferótipo A, e das amostras BO/R175 (2), BO/R148 (3), BO/R143 (4) e BO/R144 (5 e 6), classificadas como eletroferótipo B..... 27
- Figura 3.** Resultado da genotipagem G e P pela reação RT-*snm*PCR de amostras de rotavírus bovino. Linha L: marcador molecular (100pb); linhas 2,3,5 e 6: amostras de campo genotipo G6; linhas 8,11 e 12: amostra de campo P[5]; linha 10: amostra de campo P[1]; linhas 1 e 7: amostra padrão de rotavírus NCDV (G6P[1]).... 31
-

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES DE ROTAVÍRUS EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS E DE CORTE DAS REGIÕES NORDESTE E CENTRO-OESTE DO ESTADO DE SÃO PAULO

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo determinar a ocorrência de rotavírus do grupo A e a genotipagem G e P de estirpes detectadas em bezerros de rebanhos leiteiros e gado de corte, durante o período de julho de 2006 a setembro de 2008, em propriedades rurais do Estado de São Paulo, Brasil. Foram amostrados 395 bezerros, na faixa etária entre 1 e 60 dias, independentemente da manifestação clínica de diarreia, de 18 rebanhos bovinos, sendo nove de exploração leiteira e nove de gado de corte. Por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), determinou-se a ocorrência de rotavírus em 33,3% (06/18) entre os rebanhos e de 8,6% (34/395) na população amostrada. A maior frequência de infecção foi detectada em animais com idade entre 16 e 30 dias ($p < 0,01$). Foram diagnosticados bezerros infectados por rotavírus tanto em animais com sinais clínicos de diarreia (22%; 29/133) quanto naqueles clinicamente normais (1,9%; 05/262), existindo, porém, uma correlação entre a presença da infecção e a manifestação clínica da diarreia ($p < 0,01$). Em relação ao tipo de exploração, nos rebanhos leiteiros 0 percentual de ocorrência foi de 5,3% (14/264), enquanto que nos rebanhos de gado de corte o rotavírus teve maior ocorrência (15,3%; 20/131). A análise do perfil do genoma de rotavírus por EGPA identificou dois eletroferótipos distintos, cujas diferenças estavam localizadas na posição de migração dos segmentos 2, 3, 7, 8 e 9. A genotipagem pela reação em cadeia pela polimerase (RT-SNMP-PCR) das amostras de rotavírus revelou a que as estirpes circulantes nos rebanhos eram G6P[5], G10P[5], não foi possível fazer associação com o genótipo P[1].

PALAVRAS-CHAVES: Rotavírus, bovino, diarreia, RT-PCR

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ROTAVIRUS STRAINS IN DAIRY AND BEEF CATTLE IN THE NORTHEAST AND CENTRAL-EAST REGIONS OF SÃO PAULO STATE.

ABSTRACT – The present study aimed to determine the Group A rotavirus and G/P genotyping in detected virus strains in dairy and beef cattle calves from July 2006 to September 2008 in São Paulo State-Brazil farms. 395 calves in 18 flocks (9 dairy cattle and 9 beef cattle) from 1 to 60-day-old were sampled, independently whether manifesting clinically diarrhea or not. By using Polyacrylamide Gel Electrophoresis Technique (PAGE), the rotavirus occurrence of 33.3% (06/18) among flocks and 8.6% (34/395) among the population sampled were determined. The higher infection frequency was detected in 16-to-30-day-old calves ($P < 0.01$). Rotavirus-infected flocks rotavirus-infected were diagnosticated as much the ones having clinical symptoms of diarrhea (22%, 29/133) as the ones clinically normal (1.9%, 05/262), shawing a correlation between the presence of infection and the diarrhea manifestation ($p < 0.01$). Related to the kind of exploration, the occurrence in dairy cattle was 5.3% (14/264) while in the beef cattle the occurrence was higher (15.3%, 20/131). The rotavirus genome profile analysis by PAGE identified two distinct electroferotypes, in which differences were located in the following segment migration positions: 2, 3, 7, 8 and 9. The genotyping of the Rotavirus sample by polymerase chain reaction (RT-snmPCR) revealed that the circulating strains among the flocks were G6P[5], G10P[5] e G?P[1].

Keywords: Rotavirus, bovine, diarrhea, RT-PCR.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A diarreia neonatal é o principal problema sanitário que acomete os bezerros nas primeiras semanas de vida, causando grandes prejuízos devido à morbidade, mortalidade, custos com tratamento e atraso no desenvolvimento (WOODE & BRIDGER, 1975). As causas dessas infecções são, freqüentemente, multifatoriais (SNODGRASS et al., 1986; REYNOLDS et al., 1986). No entanto, entre os vários agentes detectados, um grupo assume importância, o gênero *Rotavirus*, estando envolvido em cerca de 60% dos casos (McNULTY & LOGAN, 1983).

Os rotavírus constituem um gênero da família *Reoviridae*, na qual está agrupada uma série de vírus com características morfológicas e antígenicamente relacionados (ESTES & COHEN, 1989). A partícula viral apresenta um formato icosaédrico, não-envelopado com diâmetro aproximado de 75 nm, sendo constituída por 3 camadas protéicas, designadas como capsídeo externo, capsídeo interno e core, que circundam o genoma viral. A camada interna ou core é composta pela proteína VP2, que circunda os 11 segmentos genômicos, e por duas proteínas estruturais, VP1 e VP3.

No capsídeo intermediário do virion está presente a proteína VP6, cujo antígeno viral é responsável pela especificidade de grupo e subgrupo. Atualmente, conhece-se a existência de 7 grupos antigênicos (A – G), embora a maioria das amostras clinicamente significantes em termos de prevalência animal e humana pertença ao grupo A (BRIDGER, 1987). No capsídeo externo, estão presentes as proteínas VP7 e VP4, que apresentam dois antígenos neutralizantes independentes (ESTES, 1996).

Os rotavírus possuem genoma constituído por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA), com tamanhos variando entre 662 e 3.302 pares de base (pb) e tamanho completo de 18.550 bp, com massa molecular de $2,2 \times 10^6$ Daltons (ESTES; COHEN, 1989).

O RNA genômico pode ser extraído de partículas virais e separado de acordo com os tamanhos moleculares e velocidade de migração dos segmentos, apresentando um padrão eletroforético característico (PEREIRA et al., 1983).

Os rotavírus são vírus de difícil cultivo e são eliminados em grandes quantidades com as fezes dos animais (10^9 a 10^{11} partículas por grama de fezes), o que levou ao desenvolvimento de várias técnicas de diagnóstico.

Dos vários métodos disponíveis para detectar rotavírus nas fezes, a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) tem apresentado grande sensibilidade. Por meio deste método, o padrão de migração dos 11 segmentos do RNA viral, característicos dos rotavírus, tem-se mostrado útil na discriminação entre diferentes amostras para a realização de estudos epidemiológicos, possibilitando deste modo determinar a prevalência de estirpes nas diferentes regiões geográficas e épocas do ano, monitorar padrões de transmissão, bem como investigar a origem de surtos de diarreias causadas por estes vírus (PEREIRA et al., 1983). Além dessa técnica, há o ensaio imunoenzimático, que é considerado um dos métodos imunológicos mais usados no diagnóstico da rotavirose, sendo sua utilização facilitada pela comercialização de Kits (PEREIRA et al., 1985).

Devido à importância do rotavírus do grupo A na etiologia das diarreias neonatais, torna-se necessário o estudo de sua variação antigênica. Assim, no que se refere aos rotavírus do grupo A, a classificação se faz pela antigenicidade da proteína VP7, determinando o sorotipo G, e também pela antigenicidade de VP4, definindo o sorotipo P (ESTES & COHEN, 1989).

A determinação do sorotipo G pode ser realizada pelo teste de neutralização com a adaptação das estirpes em culturas de células e posterior neutralização com soros específicos. A produção de anticorpos monoclonais (MAbs) contra epítomos específicos localizados na proteína VP7 permitiu o desenvolvimento do ensaio imunoenzimático para a determinação de sorotipo G. Mais recentemente, métodos moleculares como sondas de hibridização e a reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) com “primers” específicos dos genes codificadores da proteína VP7 foram desenvolvidos para a genotipagem de rotavírus a partir de amostras

clínicas (GOUVEA et al., 1994). Essa técnica tornou-se uma alternativa para a caracterização de rotavírus, uma vez que usa reagentes sintéticos e permite o exame de um grande número de amostras.

Até o momento, foram descritos 15 sorotipos G, denominados de G1 a G15 (HOSHINO & KAPIKIAN, 1994; FUKAI et al., 2007). Destes, G6 e G10 são encontrados com maior frequência em bovinos (SNODGRASS et al., 1990; ISHIZAKI et al., 1996). Nos humanos, foram identificados os sorotipos G1 a G4, G8, G9 e G12 (BEARDS et al., 1989; GERNA et al., 1990). O sorotipo G5 foi identificado em suínos, eqüinos e bovinos (HOSHINO & KAPIKIAN, 1994), enquanto G7 e G11 foram relatados em aves e suínos, respectivamente (HOSHINO & KAPIKIAN, 1994). Posteriormente, foram descritos três novos sorotipos, G13, G14 e G15, identificados em eqüinos (G13 e G14) (BROWING et al., 1991) e bovinos (G15) (RAHMAN et al., 2003). Entretanto tem sido cada vez mais freqüente a identificação de estirpes de rotavírus animais com sorotipos característicos de estirpes humanas e vice-versa. Assim, os sorotipos humanos G1, G2, G3 e G8 foram identificados em bovinos (HUSSEIN et al., 1993; SATO et al., 1997), enquanto os sorotipos G6 e G10, característicos de bovinos, foram relatados em humanos (NAKAGOMI & NAKAGOMI, 1993) e suínos (PONGSUWANNA et al., 1996; MARTELLA et al., 2001).

No que se refere à proteína VP4, KAPIKIAN & CHANOCK (1990) propuseram um sistema binário de classificação, os genotipos P e os sorotipos P, levando em conta se o método de análise dessa proteína foi a genotipagem ou a sorotipagem, respectivamente. Por outro lado, deve-se salientar que a caracterização dos sorotipos P torna-se mais difícil, uma vez que os reagentes para a realização de provas como os ensaios imunoenzimáticos (EIE) não estão prontamente disponíveis.

Foram descritos 12 sorotipos P e 27 genotipos P (STEYER et al., 2008), sendo os genotipos P[1] (NCDV), P[5] (UK) e P[11] (B223) freqüentemente associados a rotavirose bovina. Os genotipos são designados por número entre colchetes (ESTES, 2001).

1.2 Patogenia da infecção por rotavírus e métodos de diagnóstico

A transmissão dos rotavírus ocorre principalmente pela via fecal-oral com a ingestão de fezes ou alimentos contaminados, sendo que esses vírus alcançam a luz intestinal e destroem enterócitos maduros das porções alta e média das vilosidades do intestino delgado de animais e de humanos (ALFIERI et al., 2007). O vírus penetra nas células do vilo, multiplica-se no citoplasma celular promovendo alterações nas suas características. Para a liberação de novas partículas ocorre uma destruição de células epiteliais, causando a atrofia das vilosidades intestinais e a hipertrofia das criptas. Dessa maneira, quando há o rompimento das células, uma grande quantidade de vírions é liberada para o lúmen intestinal, sendo excretado nas fezes (FENNER; WHITE, 1976).

O mecanismo de produção de diarreia por rotavírus é causado pela diminuição da absorção dos sais e água, devido à perda do processo absorptivo das células intestinais e pela diminuição das dissacaridases produzidas por essas células, o que leva a um acúmulo de dissacarídeos na luz intestinal, fatores considerados importantes na patogenia da doença (KAPIKIAN; CHANOCK, 1990).

Animais infectados são capazes de eliminar até 10^{10} partículas virais por grama de fezes na fase aguda da doença. Uma vez no ambiente, os rotavírus são extremamente resistentes e conseguem permanecer viáveis por longos períodos, mantendo a contaminação ambiental e facilitando o ciclo de infecção nos rebanhos (SNODGRASS et al., 1986).

Apesar dos rotavírus serem espécie-específicos, a transmissão interespecie também é possível. Vários estudos têm encontrado evidências antigênicas e moleculares de recombinação *in vivo* de diferentes estirpes de rotavírus do grupo A provenientes de humanos e de animais. Estirpes virais que são geneticamente muito relacionadas com rotavírus de origem bovina, suína e eqüina, têm sido isoladas de crianças com infecções sintomáticas ou assintomáticas e nesocomiais. Reciprocamente, combinações genotípicas, comumente associados com estirpes de

rotavírus do grupo A de origem humana, estão sendo identificadas em animais (RAHMAN et al., 2003; STEYER et al., 2008).

Estudos realizados na Eslovênia e na Bélgica evidenciaram transmissão interespecíes de estirpes de rotavírus humano, suíno e bovino (STEYER et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2008).

Para o diagnóstico de rotavirose desenvolveram-se várias técnicas laboratoriais baseadas principalmente na detecção do vírus nas fezes. Entre elas, pode-se destacar a microscopia eletrônica (KAPIKIAN; CHANOCK, 1990). Outros métodos também foram padronizados para detecção do rotavírus, como a fixação de complemento, imunofluorescência (IFA), radioimunoensaio (RIA), hemaglutinação (HA) e aglutinação em látex (ALFIERI e al., 2007). O ensaio imunoenzimático (EIE) é um dos métodos mais utilizados no diagnóstico da rotavirose por ser altamente sensível, prático e permitir a análise de um grande número de amostras simultaneamente (PEREIRA et al., 1985). A composição genômica exclusiva do rotavírus faz da técnica de EGPA uma metodologia de detecção e estudo das diferenças no perfil de migração de cada segmento genômico (LUCCHELLI et al., 1992).

Atualmente merece destaque a reação de transcriptase reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), devido ao fato de ser uma das principais metodologias para a caracterização do agente (GOUVEA et al., 1990).

O sequenciamento de nucleotídios dos genes associados às proteínas VP4 e VP7 das amostras de rotavírus tem contribuído com informações sobre a origem e a evolução desse vírus.

1.3 Ocorrência de rotavírus em rebanhos bovinos no exterior

Nos bovinos, o rotavírus é reconhecido como uma das principais causas de perdas econômicas. Levantamentos epidemiológicos realizados no Canadá por McNULTY & LOGAN (1983) identificaram rotavírus em 79% das amostras de fezes examinadas de animais 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. Além disso, constataram que os primeiros casos positivos foram detectados em animais com idade inferior a 5 dias.

Este achado pode ser explicado pelas observações de DeLEEuw et al. (1980), segundo os quais vacas e bezerros aparentemente saudáveis podem eliminar o vírus nas fezes. Assim, bezerros mais velhos e vacas adultas infectadas subcl clinicamente podem representar um papel importante na disseminação da doença para bezerros mais jovens, assim como na manutenção da infecção dentro do rebanho.

THEIL & McCLOSKEY (1989) utilizaram as técnicas de EGPA e imunofluorescência para analisar casos de diarreia em rebanhos de leite e de corte dos Estados Unidos. Num total de 350 amostras, verificaram 22% de positividade, em animais entre 1 e 28 dias. Além disso, os autores encontraram grande diversidade de eletroferótipos, sendo todos característicos de rotavírus do grupo A. Também nos EUA, LUCCHELLI et al. (1992) analisaram a prevalência de rotavírus em rebanhos leiteiros de Ohio, utilizando as técnicas de contraímunoeletroforese e EIE. Os autores estudaram 450 amostras de fezes de bezerros com idade entre 1 e 30 dias, detectando 16,4% de casos positivos para rotavírus. Por meio da EGPA, verificaram também que as estirpes detectadas eram características de rotavírus do grupo A.

Pesquisadores do Japão, da África do Sul e da Argentina também se preocuparam em estudar a participação do rotavírus na etiologia da diarreia neonatal.

ISHIZAKI et al. (1995) determinaram a prevalência de rotavírus em uma fazenda de gado de leite no Japão. Os autores colheram, semanalmente, amostras de fezes de bezerros do nascimento até 8 semanas. De 219 amostras colhidas, 14,6% foram positivas para rotavírus pela técnica de EGPA. Por meio desse estudo, determinaram que os animais entre 2 e 4 semanas 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% (43/117) das 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.

Em rebanhos leiteiros argentinos, a presença de rotavírus foi investigada por FIJTMAN et al. (1987). Por meio de EGPA e EIE, os autores analisaram 211 amostras de fezes de bezerros entre 1 e 45 dias, sendo 59 de animais diarréicos e 152 de não-diarréicos. Os autores encontraram 27,2% e 11,8% de casos positivos entre os animais com e sem diarréia, respectivamente. Também na Argentina, estudos conduzidos por COSTATINI et al. (2002), utilizando as mesmas técnicas descritas acima, encontraram 40% (452/1129) de positividade em amostras de fezes de bezerros pertencentes a rebanhos bovinos leiteiros e de corte. A caracterização antigênica das estirpes por EIE com anticorpos monoclonais mostrou que 32,6% das estirpes tipadas pertenciam ao sorotipo G6, e 15,4%, ao G10. Encontraram, também, que o sorotipo G6 era predominante em rebanhos leiteiros e o sorotipo G10 predominava em rebanhos bovinos de corte.

GARAICOECHEA et al. (2006) determinaram a ocorrência de diarréia por rotavírus e a caracterização molecular das estirpes de rotavírus circulantes em rebanhos de corte e leite na Argentina durante um período de 10 anos. De 1581 amostras colhidas e analisadas por EIE foram detectadas 42,0% de casos positivos para rotavírus, correspondendo a 62,5% do total de surtos de diarréia registrados no período. Por RT-PCR foram detectados os genótipos G6P[5], predominante nos rebanhos corte, além de G6 P[11] e G10 P[11], nos rebanhos leiteiros.

1.4 Ocorrência de rotavírus bovino em rebanhos no Brasil

No Brasil, vários estudos abordaram as características epidemiológicas da infecção por rotavírus em bezerros.

As primeiras evidências sobre a possível participação desses agentes na etiologia das diarréias de bezerros, no Estado de São Paulo, foram verificadas por JEREZ et al. (1987a). Nesse trabalho, foram analisadas, por imunoeletrosmoforese, 353 amostras de soros de bezerros, com idade entre 4 e 8 meses, e 48% dessas amostras apresentaram anticorpos antirrotavírus.

Em outro trabalho, JEREZ et al. (1987b) pesquisaram amostras de fezes de bezerros e identificaram rotavírus em 20% dos animais com até 30 dias de idade. Posteriormente, JEREZ et al. (1989) estudaram as características do RNA viral de 27 amostras positivas e destacaram quatro perfis eletroforéticos distintos, sendo todos característicos de rotavírus do grupo A.

BRITO (1994) conduziu experimentos no Estado de Goiás, visando à obtenção de dados que comprovassem a participação de rotavírus infectando rebanhos bovinos, encontrando uma frequência de 7,17%, sendo que quatro tipos distintos de perfil eletroforético foram encontrados.

BUZINARO & FREITAS (2002) utilizando a técnica EGPA, determinaram a prevalência de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros no Estado de São Paulo. Examinaram 576 amostras de fezes de bezerros com idade entre 1 e 45 dias, com e sem diarreia, sendo que 28 amostras (4,9%) foram positivas para rotavírus do grupo A.

Em estudos realizados em propriedades de criação de gado bovino leiteiro, localizados em municípios do Estado de São Paulo, JEREZ et al. (2002), utilizando as técnicas EGPA e hemaglutinação, detectaram 14% de positividade para rotavírus do grupo A em amostras fecais diarreicas de bezerros. Ainda no Estado de São Paulo, BUZINARO et al. (2003), utilizando a técnica EGPA, determinaram prevalência de 63% para rotavírus em rebanhos bovinos de exploração de corte criados em sistema semi-intensivo de produção durante três estações de parição consecutivas, com presença de quatro eletroferótipos distintos.

Estudos realizados por ALFIERI et al. (2006), determinaram a frequência de rotavírus do grupo A pela técnica EGPA em animais com e sem diarreia em rebanhos de corte e leite de sete Estados brasileiros. Foram analisadas 1898 amostras de fezes de animais com diarreia e 279 amostras de animais clinicamente saudáveis, com positividade de 19,4% e 2,2%, respectivamente.

Levantamentos epidemiológicos, utilizando a técnica RT-PCR, foram realizados em várias regiões do Brasil com a finalidade de determinar as características genotípicas das estirpes de rotavírus circulantes.

BRITO et al. (1996) analisaram, por EGPA e EIE, 331 amostras de fezes de bezerros com e sem diarreia, entre 1 e 30 dias de idade, obtendo-se 9,7% de amostras positivas. A determinação de subgrupo e sorotipo com anticorpos monoclonais revelou que 62,5% pertenciam ao subgrupo I, 34,4% não reagiram com ambos os subgrupos, enquanto os sorotipos G6 e G10 foram encontrados em 46,9% e 6,3%, respectivamente.

Em outro estudo, ALFIERI et al. (1998) utilizaram a RT-PCR para a caracterização dos genotipos P e G de 20 amostras de rotavírus bovino do grupo A e identificaram os genotipos G6P[5], G6P[1] e G10P[11] em 75%, 17% e 8% das amostras examinadas, respectivamente. Posteriormente, ALFIERI (1999) 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 genotipo G6P[5] (40%; 20/50) nas amostras analisadas.

BUZINARO et al. (1999) utilizaram a RT-PCR para a caracterização do genotipo P de 13 amostras positivas para rotavírus do grupo A, colhidas de bezerros de gado bovino leiteiro do Estado de São Paulo. A RT-PCR identificou o genotipo P[11] em todas as amostras testadas.

Posteriormente, BRITO et al. (2000) realizaram a classificação das estirpes circulantes utilizando a técnica de PCR, detectando infecções singulares e mistas, com a predominância dos genotipos G6 e G10, P[5] e P[11].

BARREIROS et al. (2000) utilizaram a PCR para a caracterização genotípica de 13 amostras positivas para rotavírus do grupo A. Nesse estudo, foram identificados os genotipos G6 P[1], G8 P[1] e G6 P[11].

ALFIERI et al. (2004), realizaram a classificação das 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].

BARREIROS et al. (2004) utilizaram a RT-PCR para a caracterização dos genótipos P e G de 71 amostras de rotavírus bovino do grupo A, 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.

Considerando-se que a síndrome diarreica é um fator de desequilíbrio para a exploração pecuária, consistindo em uma das mais freqüentes doenças que afeta bovinos jovens, sendo que o rotavírus bovino é um dos principais agentes etiológicos envolvidos nesses processos e que no Brasil poucos dados abordaram sua ocorrência em criações de exploração de gado de corte e leite, justificam-se estudos nessa área. Ainda, estudos sobre a variabilidade genética fornecem dados úteis para o estabelecimento de ação epidemiológica e também para o desenvolvimento e monitoramento de vacinas.

2. OBJETIVOS

1. Determinar a ocorrência de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros e de corte de propriedades rurais localizadas nas regiões nordeste e centro-oeste no Estado de São Paulo.

2. Analisar o perfil eletroforético do genoma dos rotavírus identificados nessas amostras.

3. Estudar a distribuição dos rotavírus em bezerros, com e sem diarreia, na faixa etária de 1 a 60 dias, verificando a possível existência de animais portadores desse vírus.

4. Realizar a caracterização genotípica (G e P) dos rotavírus identificados, por meio da RT-*snm*PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das amostras de fezes

O trabalho foi realizado em fazendas de criação de gado bovino de corte e leite localizadas nos municípios de Orlândia, Jaboticabal, Colina, São José do Rio Preto, Catiguá, Batatais, Votuporanga, Araçatuba, Franca, Taiaçu, Descalvado, Guariba, Monte Aprazível e Pontalinda, pertencentes às regiões nordeste e centro-oeste no Estado de São Paulo (Figura 1).

Foram colhidas 395 amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, com e sem quadro clínico de diarreia, no período de julho de 2006 a setembro de 2008. Dessas, 131 foram obtidas de rebanhos de corte e 264 de rebanhos leiteiros. Foram amostrados 18 rebanhos, sendo nove de gado leiteiro e nove de gado de corte. As amostras de fezes foram obtidas diretamente da ampola retal em sacos plásticos e mantidas em condição de refrigeração até a chegada ao Laboratório no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, Campus de Jaboticabal.

No laboratório, as amostras foram armazenadas a temperaturas de -20°C, sendo posteriormente analisadas para a pesquisa de rotavírus por meio da técnica de EGPA.

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

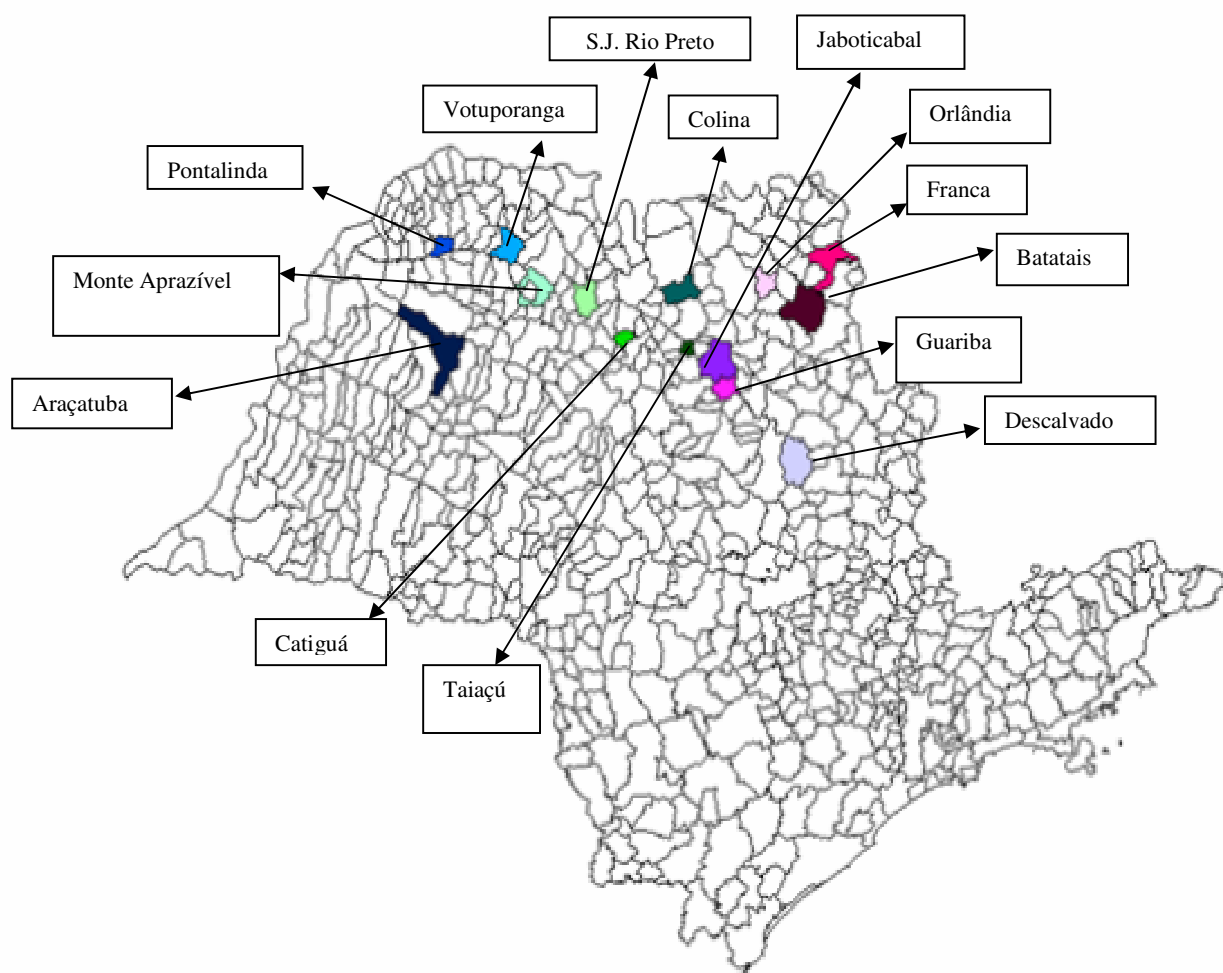


Figura 1. Mapa do Estado de São Paulo destacando os municípios onde estão localizados os rebanhos estudados, no período de julho de 2006 a setembro de 2008.

3.2 Pesquisa de rotavírus nas fezes pela técnica da EGPA

A análise das amostras fecais para detecção de rotavírus foi realizada por meio da EGPA, de acordo com HERRING et al. (1982).

3.2.1 Preparo da suspensão fecal

Suspensões fecais a 20% foram preparadas em tampão Tris/Cálcio (TrisHCL 0,1 M; CaCl 1,5 mM pH 7,3), homogeneizadas e centrifugadas a 11.400xg por 30 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para tubos de vidro e tratado com igual volume de freon TF (Triclorofluoretano MERCK) e nova centrifugação foi efetuada a 1.030xg por 15 minutos. A suspensão foi utilizada para a extração do RNA viral ou estocado a -20°C para posterior análise.

3.2.2 Extração do ácido nucléico viral

Para extração do RNA viral, 0,4 mL de suspensão fecal foi adicionado a tubos contendo 40µL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10%, incubando-se a mistura a 37°C por 30 minutos. A seguir, adicionaram-se 0,2 mL de fenol e 0,2 mL de clorofórmio, incubando-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Após centrifugação a 1.030g, o sobrenadante foi transferido para tubos tipo eppendorf contendo 40 µL de NaCl a 20%. Em seguida, adicionou-se 1 mL de etanol e a mistura foi incubada a -20°C por 18 horas. Decorrido esse período, os tubos foram centrifugados a 11.000xg por 30 minutos a 4°C, em centrífuga *Eppendorf* refrigerada, modelo 5840R. O sobrenadante foi desprezado, e o material precipitado a seco, em temperatura ambiente, deixando-se os tubos em posição invertida sobre papel de filtro. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 20 µL de dissociador de amostra (3% SDS; 12,5% de Tris/HCl 0,5 M pH 6,8; 5% de 2-mercaptoetanol; 0,005% de azul de bromofenol; 40% de glicerol) e incubado por 30

minutos em banho-maria a 37°C. Após esta última etapa, a amostra estava pronta para ser distribuída no gel de poliacrilamida.

3.2.3 Preparo do gel de poliacrilamida

O gel de poliacrilamida foi preparado com solução-estoque de acrilamida/bisacrilamida na concentração 30/0,8.

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%. Primeiramente, adicionou-se o gel inferior (acrilamida 7,5% - bisacrilamida 0,2%; TEMED 0,2%; persulfato de amônio 0,03%). Após a polimerização adicionou-se o gel superior (acrilamida 3,5% - bisacrilamida 0,04%, TEMED 0,2%, persulfato de amônio 0,015%), sendo colocado o pente imediatamente na abertura superior, para a formação das canaletas.

O gel foi posicionado na cuba de corrida, e os reservatórios desta, preenchidos com tampão de corrida Tris/Glicina (tris 0,025M, glicina 0,109M, pH 8,3). Realizou-se a corrida a 20mA por placa, durante 2 horas e 30 minutos.

3.2.4 Coloração do gel

O processo de coloração com nitrato de prata foi realizado de acordo com HERRING et al (1982).

Após ser tirado da cuba, o gel foi lavado três vezes com água destilada e fixado durante 30 minutos em solução de etanol (10%) e ácido acético (1%). Em seguida, realizou-se a coloração com solução de nitrato de prata 0,011M, durante 60 minutos e sob agitação. Transcorrido o tempo, desprezou-se a solução e lavou-se o gel para a retirada do excesso e foi adicionada solução reveladora de hidróxido de sódio 0,75M e formaldeído 0,95%, até ser possível visualizar os segmentos do genoma viral.

O processo de coloração foi bloqueado com solução de ácido acético 5%, e o gel conservado em solução de etanol a 10%.

3.2.5 Fotografia do gel

Para fotografar o gel foi utilizada câmera Nikon 2FM2, objetiva macro de 55mm e filme Fuji, asa 100.

3.3 Amostra padrão de rotavírus

A amostra padrão NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Vírus) de rotavírus bovino, cedida pelo Prof. Dr. Amauri Alfieri, da Universidade Estadual de Londrina/PR, foi utilizada como parâmetro de comparação com as amostras de campo.

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, foram preparadas culturas de células da linhagem MA-104 utilizando-se frascos para cultura descartáveis, de poliestireno, com 25cm², da marca TPP-Suíça. As células foram cultivadas com meio D-MEM (Mínimo Essencial Médium – Dulbecco), com 10% de soro fetal bovino, seguindo-se as recomendações de TSUNEMITSU et al (1991). As culturas que apresentaram uma monocamada confluyente foram tripsinizadas e colocadas em estufa a 37°C, acompanhando o desenvolvimento da monocamada através de microscópio invertido.

O preparo do inóculo foi feito utilizando suspensão fecal a 20% (item 3.2.1) filtrado em membrana filtro Mileyx – Millipore de 0,22µm de porosidade. Após filtração, 0,5 mL da suspensão fecal foi misturada com 30 µL de V.A.S. (Virus Activation Solution) que contem tripsina cristalina na proporção de 5mg/mL de meio, para clivagem do VP4 em VP5 e VP8 e, incubada em banho-maria por 30 minutos.

Antes da inoculação, as garrafas foram lavadas três vezes com PBS pH 7,2, o inóculo transferido para a monocamada e a adsorção 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 e a comprovação do isolamento foi realizada pela técnica de EGPA.

3.4 Genotipagem das amostras positivas

A PCR foi utilizada para a caracterização dos genotipos G e P de rotavírus bovino, baseando-se na técnica descrita por GOUVEA et al. (1990).

Para a classificação, foi levado em consideração o comprimento (número de pares de base) do segmento genômico produzido e amplificado na PCR, comparado aos padrões de vírus cultivados em células MA.

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 20% preparada em tampão Tris/Cálcio (TrisHCl 0,1M; CaCl 1,5mM, pH 7,3) e centrifugada a 3.000xg por 15 minutos a 4°C, em centrífuga *Eppendorf* refrigerada, modelo 5840R. Em microtubos livres de RNases e DNases, autoclavados, foram adicionados 250µL de suspensão fecal e 750µL de Trizol Reagent® (Gibco BRL) e homogeneizados. Após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 200µL de clorofórmio (Merck). As amostras foram submetidas à centrifugação de 11.000xg, à temperatura de 4°C, por 15 minutos, em centrífuga *Eppendorf* refrigerada, e os sobrenadantes transferidos a novos tubos tipo 'eppendorf'. Foram adicionados 500µL de álcool isopropílico, agitando-os suavemente e incubando-os a -20°C por 18 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 11.000xg, à temperatura de 4°C, por 15 minutos, e os sobrenadantes desprezados. Os materiais precipitados ('pellet') foram lavados 1 vez com 1mL de álcool etílico a 75%, homogeneizados suavemente e submetidos a nova centrifugação de 9.000xg durante 5 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram

descartados e, após secagem, os pellets ressuspensos em 20µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

3.4.2 Síntese de cDNA e reação em cadeia pela polimerase

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o kit SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum® Taq (Invitrogen – Life technologies), processando-se numa 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*.

A 5µL do produto de extração do RNA foram adicionados 25µL do tampão de reação (2x Reaction mix – 0,4mM de dNTPs; 2,4mM MgSO₄), 1µL das enzimas RT/Platinum Taq (Transcriptase Reversa e Taq polimerase) e 1µL de cada primer senso e anti-senso descritos na tabela 1, específicos para cada um dos genótipos G ou P, na concentração final de 10µM cada. O volume da reação foi completado para 50µL com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

A genotipagem P e G foi realizada separadamente. Para cada uma das características foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (primers) sorotipo-específicos e complementares às seqüências gênicas que codificam para as proteínas VP7 e VP4.

Para a amplificação do gene 9 (VP7 – genótipo G), foram utilizados os primers senso Beg 9 e anti-senso End 9. A síntese de cDNA foi realizada incubando-se a reação por 30 minutos a 50°C seguido de 1 ciclo de 2 minutos a 94°C. Na seqüência, o cDNA produzido foi amplificado executando-se 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C. A extensão final foi realizada por 5 minutos a 72°C.

Para a amplificação do gene 4 (VP4 – genótipo P), foram utilizados os primers senso con 3 e anti-senso con 2. A síntese de cDNA foi realizada incubando-se a reação por 30 minutos a 50°C seguido de 1 ciclo de 2 minutos a 94°C. Na seqüência, o cDNA

produzido foi amplificado executando-se 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 60 segundos a 72°C. A extensão final foi realizada por 5 minutos a 72°C.

3.4.3 *Semi-nested* multiplex PCR

A classificação das estirpes de rotavírus foi realizada por meio de uma reação de *semi-nested* Multiplex PCR. Foram tomados 1µL do cDNA da primeira amplificação em tubos tipo eppendorf de 200µL, para caracterização do genotipo G e 10µL para o genotipo P e adicionado 5µL de 10x PCR buffer II; 1,5µL de MgCl₂ 50mM; 1µL de dNTPs 10mM; 3,0µL de primer mix (G ou P); 0,25µL de Taq polimerase (5U/µL) e 17µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) para completar volume final de 50µL.

Para a caracterização do genotipo G, o primer mix foi composto pelos oligonuclotídeos DT6, HT8, ET10 e o primer senso Beg 9, na concentração final de 0,20µM cada. Para a classificação do genotipo P, o primer mix foi composto pelos primers pNCDV, pUK, pB223, pGOTT, pOSU e o primer anti-senso con 2, na concentração final de 0,20µM cada.

A reação de Multiplex PCR foi processada por 3 minutos a 94°C, seguida de 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, 90 segundos a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 5 minutos.

Ao final da reação, 8 µL do produto foram diluídos em 2µL tampão de carregamento e analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5x (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA 0,002M pH 8,0) contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). A corrida eletroforética foi realizada a 90V por 1 hora e 30 minutos, e a leitura foi realizada sob luz ultravioleta em leitor tipo Gel Doc da marca BioRad.

Na tabela 1, são apresentadas as sequências de cada primer, sua posição no genoma, as estirpes a partir das quais as sequências foram tomadas e o comprimento do segmento gênico esperado.

Tabela 1. Sequência dos iniciadores e sua localização no genoma dos rotavírus, bem como o comprimento do segmento amplificado.

Genótipo	Primer	Seqüência (5' → 3')	Bp**	Posição	Estirpe
P	Con2*	ATTTCCGACCATTTATAACC		868-887	KU
	Con3*	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA	877	11-32	KU
	pNCDV	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	622	269-289	SA ₁₁
	pUK	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	555	336-354	UK
	pB223	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	314	574-594	B223
G	Beg9*	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTG		1-28	Wa
	End9*	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	1062	1062-1036	UK
	DT6	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	500	499-481	UK
	HT8	CGGTTCCGGATTAGACAC	274	273-256	B37
	ET10	TTCAGCCGTTGCGACTTC	715	714-697	B223

* "Primers usados para amplificar sequências completa

** comprimento do segmento amplificado

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 (χ^2), de acordo com THRUSFIELD (1995).

4. RESULTADOS

4.1 Triagem 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 EGPA e os resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados da EGPA aplicada em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, em rebanhos bovinos leiteiros e de corte das regiões Nordeste e Centro-Oeste no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 e setembro de 2008.

Localidade	<u>Rebanhos</u> Positivos / Examinados	%	<u>Amostras</u> Positivas / Total	%
Orlândia	0/1	0	0/5	0
Jaboticabal	0/4	0	0/33	0
Colina	0/1	100	0/4	0
S.J. Rio Preto	1/2	50	5/14	35,7
Catigua	0/1	0	0/10	0
Batatais	0/1	0	0/6	0
Votuporanga	0/1	0	0/26	0
Araçatuba	1/1	100	15/23	65,2
Franca	0/1	0	0/48	0
Taiaçu	1/1	100	1/66	1,5
Descalvado	1/1	100	11/149	7,4
Guariba	1/1	100	1/5	20
Monte Aprazível	0/1	0	0/5	0
Pontalinda	1/1	100	1/1	100
TOTAL	06 / 18	33,3	34/395	8,6

Dos 18 rebanhos amostrados no presente trabalho, 6 apresentaram resultados positivos para rotavírus do grupo A, com taxa de ocorrência de 33,3% entre os rebanhos analisados. Os rebanhos com casos positivos para rotavírus estavam

localizados nos municípios de Colina, São José do Rio Preto, Araçatuba, Taiaçu, Descalvado e Pontalinda.

Os resultados da EGPA mostram que das 395 amostras de fezes colhidas de animais que manifestavam ou não quadro de diarreia e com idade entre 1 e 60 dias, 34 foram positivas para rotavírus, o que representa uma taxa de ocorrência de 8,6% na população amostrada.

Na Tabela 3, os resultados das amostras de fezes de bezerros submetidas ao teste de EGPA para a detecção de rotavírus bovino, segundo o tipo de exploração da propriedade, mostram que dos nove rebanhos leiteiros, quatro (44,4%) apresentaram animais eliminando rotavírus, enquanto 22,2% (02/09) de positividade foi detectada em propriedades com exploração de corte. As porcentagens de amostras positivas detectadas nos rebanhos leiteiros e de gado de corte foram, respectivamente, 11% e 39,2% (Tabelas 4 e 5).

Tabela 3. Resultados da EGPA para a detecção de rotavírus do grupo A em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, separados pelo tipo de exploração do rebanho, nas regiões Nordeste e Centro-Oeste no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 e setembro de 2008.

Categoria	Rebanho	%	Amostras	%
	Positivo/Total		Positivas/Total	
Leite	4/9	44,4	14/264	5,3
Corte	2/9	22,2	20/131	15,3
Total	6/18	33,3	34/395	8,6

Pela Tabela 4, observa-se que das 51 amostras de fezes colhidas de animais com sinais clínicos de diarreia, nas propriedades de gado de corte, 39,2% (20/51) apresentaram resultados positivos para rotavírus na EGPA, enquanto nenhuma amostra positiva foi detectada em bezerros não-diarreicos. As frequências de positividade detectadas em animais dos rebanhos R4 e R8, situados nos municípios de São José do Rio Preto e Araçatuba foram de 83,3% (R4) e 62,2% (R8), respectivamente.

Os resultados, quando submetidos à análise estatística pelo teste qui-quadrado ($\chi^2 = 34,05$; $p < 0,01$), mostraram uma relação significativa entre a ocorrência de rotavírus e a manifestação clínica de diarreia.

Tabela 4. Resultados da EGPA para a detecção de rotavírus do grupo A em amostras de fezes de bezerros de rebanhos de corte, na faixa etária de 1 a 60 dias, segundo a consistência das fezes, nas regiões Nordeste e Centro-Oeste no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 e setembro de 2008.

Município	Rebanho Nº	Animais com diarreia Amostra+/Total	%	Animais sem diarreia Amostra+/Total	%	Total	%
Orlândia	R1	0/5	0	0/0	0	0/5	0
Jaboticabal	R2	0/3	0	0/0	0	0/3	0
Colina	R3	0/4	0	0/0	0	0/4	0
S.J.Rio Preto	R4	5/6	83,3	0/0	0	5/6	83,3
Catigua	R5	0/6	0	0/4	0	0/10	0
Batatais	R6	0/3	0	0/3	0	0/6	0
Votuporanga	R7	0/3	0	0/23	0	0/26	0
Araçatuba	R8	15/21	71,4	0/2	0	15/23	62,2
Franca	R9	0/0	0	0/48	0	0/48	0
Total		20/51	39,2	0/80	0	20/131	15,3

Em propriedades de gado leiteiro, das 82 amostras de fezes colhidas de animais com diarreia, nove (11%) foram positivas para rotavírus na EGPA. A frequência de positividade obtida de animais sem diarreia foi de 2,7% (Tabela 5). Nos rebanhos R10, R14, R15 e R17 foram detectados casos positivos para rotavírus em animais com e sem manifestação clínica de diarreia com índices de 1,5%, 7,4%, 20% e 100%, respectivamente.

A análise estatística pelo teste do qui-quadrado revelou uma relação significativa entre a detecção de rotavírus e o quadro clínico de diarreia ($\chi^2 = 31,11$ $p < 0,01$).

Tabela 5. Resultados da EGPA para detecção de rotavírus do grupo A em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 60 dias, em rebanhos leiteiros das regiões Nordeste e Centro-Oeste no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 a setembro de 2008.

Município	Rebanho Nº	Animais c/ diarreia Amostras +/total	%	Animais s/ diarreia Amostras +/total	%	Total	%
Taiacu	R10	1/11	9,1	0/55	0	1/66	1,5
Jaboticabal	R11	0/10	0	0/4	0	0/14	0
	R12	0/1	0	0/5	0	0/6	0
	R13	0/0	0	0/10	0	0/10	0
Descalvado	R14	7/55	12,7	4/94	4,3	11/149	7,4
Guariba	R15	0/1	0	1/4	25	1/5	20,0
S.J. do Rio Preto	R16	0/3	0	0/5	0	0/8	0
Monte Aprazível	R17	0/0	0	0/5	0	0/5	0
Pontalinda	R18	1/1	100	0/0	0	1/1	100
Total		9/82	11,0	5/182	2,7	14/264	5,30

Conforme pode ser verificado na Tabela 6, a maior ocorrência de amostras positivas foi observada em animais com idades entre 16 e 30 dias, com percentual de 13,8% (23/167). Na faixa etária entre 1 e 15 dias, 11,4% foram positivos para rotavírus, enquanto a frequência de positividade entre os animais com idades de 31 a 45 e 46 a 60 dias foi de 1,6% (01/64) e 1,2 (01/85), respectivamente.

Os resultados dessa tabela foram submetidos à análise estatística pelo qui-quadrado e os valores obtidos mostraram que as faixas etárias de 1 a 15 e 16 a 31 dias apresentaram maior frequência quando comparadas com as demais ($p < 0,01$).

Tabela 6. Resultado das amostras positivas para rotavírus do grupo A pela EGPA, segundo a divisão de faixa etária com intervalo de 15 dias e a manifestação ou não de diarreia, nos rebanhos analisados das regiões nordeste e centro-oeste no estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 a setembro de 2008.

Idade do animal (dias)	Animais diarreicos Amostras+/total	%	Animais não-diarreicos Amostras+/total	%	Total	%
1 a 15	7/35	20	2/44	4,5	9/79	11,4
16 a 30	20/66	30,3	3/101	3	23/167	13,8
31 a 45	1/21	4,8	0/43	0	1/64	1,6
46 a 60	1/10	10	0/75	0	1/85	1,2
Total	29/132	22	05/263	1,9	34/395	8,6

4.2 Análise do perfil eletroforético do genoma de rotavírus pela técnica de EGPA

De acordo com as características de migração eletroforética do genoma viral, pôde-se agrupar os perfis encontrados em dois eletroferótipos distintos denominados, ao acaso, de A e B. Dentre as 34 amostras positivas para rotavírus, três pertenciam ao eletroferótipo A e 12 ao B, todos característicos de rotavírus do grupo antigênico A; 19 amostras não foram classificadas.

Na Figura 2 são apresentados os perfis eletroforéticos do genoma de rotavírus das amostras BO/R 51/08, BR/R 175/07, BO/R 148/07, BO/R 143/07, BO/R 144/07, pertencentes aos perfis A e B.

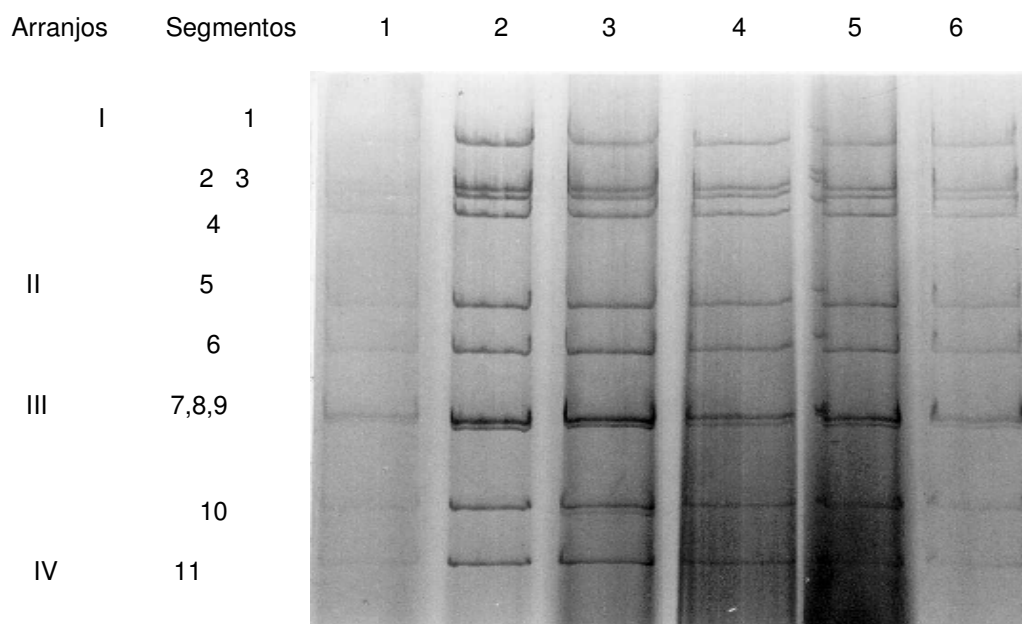


Figura 2. Perfil eletroforético do genoma de rotavírus do grupo A da amostra BO/R^{*}51/08 (1) eletroferótipo A, e das amostras BO/R^{*}175 (2), BO/R148 (3), BO/R143 (4) e BO/R144 (5 e 6), classificadas como eletroferótipo B.

As principais diferenças encontradas na velocidade de migração dos segmentos genômicos de rotavírus bovino foram verificadas comparando-se os perfis eletroforéticos quando distribuídos separadamente no gel. Assim, de acordo com a velocidade de migração dos segmentos de rotavírus, as diferenças foram relativas à posição dos segmentos dos arranjos I e IV. Comparando-se os perfis A e B da Figura 2, foram detectadas alterações na posição dos segmentos 2 e 3 do arranjo I e segmentos 10 e 11 do arranjo IV.

Conforme apresentado na Tabela 7, foi identificado no Município de Descalvado (R14) um eletroferótipo (A). Das onze amostras positivas para rotavírus nesse município, duas pertenciam ao eletroferótipo A, enquanto nove amostras não foram classificadas, por apresentar segmentos muito claros, difíceis de serem comparados. No rebanho R10, do Município de Taiaçu, também foi encontrada uma amostra de perfil

^{*} BO/R – nomenclatura padrão para estirpes de rotavírus infectando bovinos (ESTES; COHEN, 1989)

A. Em Araçatuba (R8), doze amostras foram classificadas como perfil B, enquanto nos rebanhos situados nos municípios de São José do Rio Preto (R4), Guariba (R15) e Pontalinda (R18) as amostras não foram classificadas.

Tabela 7. Tipos eletroforéticos de rotavírus distribuídos segundo os municípios e os rebanhos de origem, de alguns municípios no Estado de São Paulo, no período de julho de 2006 a setembro de 2008.

Município/categoria	Rebanho	Amostra*	Perfis eletroforéticos		Amostras não-classificadas
			A	B	
Corte					
S. J. do Rio Preto	R4	5			5
Araçatuba	R8	15		12	3
Leite					
Taiacu	R10	1	1		
Descalvado	R14	11	2		9
Guariba	R15	1			1
Pontalinda	R18	1			1
Total		34	3	12	19

• = Positivo

4.3. Classificação das amostras virais pela RT-*snm*PCR

A caracterização dos genótipos G e P de rotavírus foi realizada em 17 dentre as 34 amostras positivas para rotavírus do grupo A (50%). No que se refere à genotipagem G animal, observou-se a ocorrência do genótipo G6 em oito amostras, enquanto duas amostras foram identificadas como G10. Para o genótipo P, onze amostras foram classificadas como P[5] e três como P[1]. Observou-se a ocorrência de 2 diferentes associações entre os genótipos G e P; G6P[5] em 7 amostras e G10P[5] em 2 amostras. Não foi possível fazer associação em 3 amostras identificadas como P[1], em 4 amostras identificadas como P[5] e em 3 amostras identificadas como G6 (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado da genotipagem das amostras positivas para rotavírus do grupo A pela RT seguida de semi-nested multiplex PCR (RT-*snm*PCR), em rebanho bovinos leiteiros e de corte de municípios no Estado de São Paulo, Brasil, colhidas entre julho de 2006 a setembro de 2008.

Genótipo	P[1]	P[5]	Não P	Total G
G6		5	3	8
G10		2		2
Não G	3	4		7
Total P	3	11	3	17

A comparação entre os diferentes perfis eletroforéticos e os genótipos identificados está relacionada na Tabela 9. As amostras BO/R 198/08, BO/R 199/08, BO/R 211/08, BO/R 212/08 e BO/R 214/08, todas provenientes do rebanho situado em Araçatuba (R8), foram classificadas com perfil eletroforético B e identificadas como genótipo G6P[5]. As amostras BO/R 144/07 e BO/R 146/07, de São José do Rio Preto (R4), foram identificadas como G10P[5], mas não foi possível classificá-las quanto ao perfil eletroforético.

Tabela 9. Resultado da eletroferotipagem e genotipagem das amostras positivas para rotavírus do grupo A pela RT-*snm*PCR, segundo o rebanho de origem, em municípios no Estado de São Paulo, colhidas entre julho de 2006 a setembro de 2008.

Amostras Genotipadas	Rebanho	Perfil eletroforético	Genotipo G	Genotipo P
BO/R 162/06	R12	NC*	NT**	P[1]
BO/R 165/06	R12	NC	NT	P[1]
BO/R 78/07	R12	A	NT	P[1]
BO/R 144/07	R4	NC	G10	P[5]
BO/R 145/07	R4	NC	NT	P[5]
BO/R 146/07	R4	NC	G10	P[5]
BO/R 196/08	R8	B	NT	P[5]
BO/R 198/08	R8	B	G6	P[5]
BO/R 199/08	R8	B	G6	P[5]
BO/R 203/08	R8	B	G6	NT
BO/R 204/08	R8	B	G6	NT
BO/R 206/08	R8	B	G6	NT
BO/R 210/08	R8	B	NT	P[5]
BO/R 211/08	R8	B	G6	P[5]
BO/R 212/08	R8	B	G6	P[5]
BO/R 213/08	R8	B	NT	P[5]
BO/R 214/08	R8	B	G6	P[5]

NC* = não classificada

NT** = não genotipada

Na figura 3 estão representados os segmentos amplificados para a genotipagem G e P, mostrando o perfil de migração dos genotipos G6 (segmento de 500pb) e P[5] (555pb) das amostras de campo BO/R 198/08, BO/R 211/08 e BO/R 212/08. A amostra BO/R 78/07 amplificou o segmento 622pb referente ao genotipo P[1].



Figura 3. Resultado da genotipagem G e P pela reação RT-*snm*PCR de amostras de rotavírus bovino. Linha L: marcador molecular (100pb); linhas 2,3,5 e 6: amostras de campo genotipo G6; linhas 8,11 e 12: amostras de campo P[5]; linha 10: amostra de campo P[1]; linhas 1 e 7: amostra padrão de rotavírus NCDV (G6P[1]).

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.

No Brasil, vários estudos abordaram características epidemiológicas, mas são poucos os trabalhos de caracterização molecular desse vírus em rebanhos bovinos de exploração de corte e leite no Estado de São Paulo.

Considerando-se 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. Diante do exposto, foi desenvolvido o presente estudo com a finalidade de determinar a ocorrência de rotavírus e as características dos genotipos P e G em amostras de rebanhos bovinos de exploração de corte e leite, no Estado de São Paulo.

Entre os rebanhos bovinos amostrados foi determinado um percentual de ocorrência de rotavírus de 33,3%(Tabela 2), o que mostra intensa circulação do vírus nos rebanhos. Comparando com os dados de prevalência disponíveis, encontra-se uma grande variação de valores, sendo que prevalências elevadas de 63,8% a 78% são relatados por pesquisadores (SNODGRASS et al., 1986; BUZINARO et al.,2003). Deve ser destacado que, nos estudos citados, 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.

O percentual de ocorrência de rotavírus na população amostrada foi de 8,6% (Tabela 2), valor inferior ao encontrado por REYNOLDS et al. (1986) que observaram uma porcentagem de positividade de 42% em rebanhos bovinos da Inglaterra. Quando se compara o resultado do presente estudo com trabalhos realizados no Brasil, verifica-

se também que ele é inferior ao obtido por JEREZ et al. (2002), que detectaram 14% de positividade, e próxima à obtida por BUZINARO & FREITAS (2002) e BRITO (1994), que constataram que os rotavírus estavam associados a 4,9% e 7,14% dos casos estudados em rebanhos bovinos leiteiros dos Estados de São Paulo e Goiás, respectivamente. Vale ressaltar que a amostragem obtida no presente estudo foi realizada em animais independentemente da manifestação clínica de diarreia, correspondendo a 66,3% (262/395) do total de amostras colhidas, o que contribuiu para diminuição do percentual de ocorrência de rotavírus, conforme também sugerido por LUCCHELLI et al. (1992).

Verifica-se, na tabela 3, a diferença entre o percentual de ocorrência de rotavírus em bezerros de propriedades de exploração de bovinos de corte e leite com valores de 15,3% e 5,3%, respectivamente. ALFIERI et al. (2006), estudando rebanhos bovinos de exploração de corte e leite em sete Estados brasileiros, também encontraram um percentual maior em animais de corte (22,8%) em relação aos leiteiros (16,4%). Apesar das propriedades de corte apresentarem um sistema de manejo mais extensivo, expondo os animais a uma menor pressão da infecção, era de se esperar que a taxa de infecção nas primeiras semanas de vida fosse inferior àquela detectada e, portanto, comparável aos encontrados em estudos com rebanhos leiteiros no Brasil (BUZINARO & FREITAS, 2002; BRITO, 1994). No entanto, o manejo reprodutivo adotado na criação de gado de corte no Brasil, permitindo que os nascimentos se concentrem na estação das chuvas, pode estar contribuindo para aumentar a difusão do vírus e conseqüentemente a incidência de diarreia nos rebanhos de corte.

A identificação de animais infectados tanto no grupo de bezerros diarreicos (22%) quanto em animais clinicamente saudáveis (1,9%) é de grande importância epidemiológica (Tabela 6), pois a presença de animais sadios que eliminaram o vírus sugere a existência de portadores assintomáticos nos rebanhos e, conseqüentemente, de prováveis fontes de infecção para outros animais (FIJTMAN et al., 1987; LUCCHELLI et al., 1992). Outro fator a ser questionado é que a técnica empregada na detecção do rotavírus nas fezes, EGPA, apresenta grande sensibilidade podendo detectar pequeno número de partículas virais. Assim, bezerros amostrados após o

período de diarreia aguda provavelmente continuaram a eliminar o vírus nas fezes em quantidades compatíveis com o limiar de detecção da técnica descrita.

Na Tabela 6 são apresentados os dados de ocorrência de rotavírus em bezerros dividindo a faixa etária em intervalos de 15 dias. A faixa etária que apresentou maior frequência de infecção foi de animais entre 16 e 30 dias, com ocorrência de 13,8%. A análise estatística revelou diferença significativa entre as faixas etárias e a presença de rotavírus nas fezes, com maior probabilidade de ocorrência em animais com idade entre 16 e 30 dias ($p < 0,01$).

A esse respeito a literatura tem constatado que, em rebanhos bovinos, a taxa de infecção é maior nas primeiras semanas de vida, sendo que a eliminação de partículas virais pelas fezes coincide com a queda de anticorpos de origem colostrar no lúmen intestinal, tornando o bezerro susceptível à infecção logo após o nascimento (McNULTY; LOGAN, 1983; ISHIZAKI et al., 1995; BUZINARO & FREITAS, 2002).

Dentre as 34 amostras positivas para rotavírus na EGPA, somente foi possível analisar o perfil eletroforético de 15 amostras, sendo 12 de gado de exploração de corte (R8) e três de gado bovino leiteiro (R10 e R14) (Figura 2).

Os rebanhos situados nos municípios de Taiacú (R10) e Descalvado (R14) apresentaram amostras com perfis semelhantes (A), ambas obtidas de gado leiteiro. As outras 12 amostras classificadas com perfil B pertenciam ao rebanho situado no município de Araçatuba (R8), de gado de exploração de corte (Tabela 7). ISHIZAKI et al. (1995), estudando rebanhos de gado de leite no Japão, também não encontraram variação de perfil eletroforético entre amostras de campo quando estudadas por determinado período de tempo. Por outro lado, há trabalhos com rebanhos bovinos leiteiros mostrando grande variação de perfil eletroforético entre as amostras estudadas (MENDES et al. 1993; BUZINARO et al., 2000).

Deve-se ressaltar que a análise do perfil do genoma pela EGPA é uma técnica útil para se distinguir diferenças entre estirpes de campo e fornecer informações sobre o significado epidemiológico da variação genômica dos rotavírus, porém não fornece dados sobre antigenicidade.

A genotipagem das amostras positivas para rotavírus na EGPA permitiu caracterizar genomicamente as estirpes de rotavírus circulantes (Tabela 8). Foi utilizada a técnica RT-PCR, seguida pela semi-nested multiplex-PCR, utilizando-se iniciadores (*primers*) específicos para os principais genótipos G e P associados à rotavirose bovina e suína.

Na classificação quanto ao genótipo G, dois diferentes genótipos foram detectados: os genótipos G6 e G10. O genótipo G6 foi encontrado em 47,06% (08/17) das amostras genotipadas e o G10, em 11,76% (02/17). Estirpes com os genótipos G6 e G10 já foram anteriormente observadas em rebanhos brasileiros por BRITO (2000) que identificou o genótipo G6 como sendo mais freqüente em rebanhos bovinos do Estado de Goiás e por ALFIERI et al. (2004) que detectaram o genótipo G6 e G8 como os mais freqüentes em rebanhos de bovinos de exploração de corte e leite em três estados brasileiros.

Em estudos realizados em rebanhos bovinos do Japão e Índia, também detectaram os genótipos G6, G8 e G10 como os mais freqüentes (FUKAY et al., 2002; SARAVANAN et al., 2006)

Para o genótipo P, as estirpes virais genotipadas foram P[1] e P[5], com freqüência de 17,65% (03/17) e 64,71% (11/17), respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por ALFIERI et al. (2004) quando estudaram rebanhos dos Estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná, verificando predominância do genótipo P[5] em 66% das amostras analisadas. BARREIROS et al (2004) detectaram os genótipos P[11] e P[5] em 57% e 43% das amostras genotipadas, respectivamente.

Em estudos realizados 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 de genótipo P[5].

Tanto o genótipo G8 quanto o P[11] não foram identificados no presente trabalho, mas já foram descritos em trabalhos realizados no Brasil (ALFIERI et al., 2004) e em outros países (FUKAI et al., 2002; FALCONE et al., 1999).

Apesar da genotipagem ter sido realizada com o uso de protocolo descrito por outros autores e as reações terem sido otimizadas para o máximo de aproveitamento

dos reagentes, o número de amostras não genotipadas foi alta (50%; 17/34). Uma das possíveis explicações para a não genotipagem dessas amostras é o fato do RNA ser extraído diretamente de amostras fecais, podendo ocorrer uma coprecitação de substâncias inibidoras presentes nas fezes. Essas substâncias atuam nos primeiros passos da amplificação da PCR, inibindo a desnaturação e o anelamento dos iniciadores (GOUVEA et al. 1990). Outro fator que pode ter contribuído para falhas na genotipagem foi o armazenamento das amostras por um longo período (dois anos), a -20°C , o que pode levar a uma diminuição do título viral e, conseqüentemente, uma quantidade pequena de RNA extraído das suspensões fecais.

Também pode ser destacada a utilização de *primers* associados somente à rotavírus bovina e suína, caracterizando amostras que tenham os genótipos específicos para essas duas espécies animais; não sendo possível a genotipagem de amostras caracterizadas por genótipos de outras espécies animais ou humanos.

Conhecer as combinações de genótipos existentes nos rebanhos brasileiros é extremamente importante, pois oferece informações para uma possível imunização artificial ativa dos animais. Por outro lado, autores relatam que a imunização contra rotavírus produz respostas ineficientes, uma vez que na natureza ocorre grande diversidade de genótipos P e G, havendo assim uma necessidade em se produzir vacinas que contenham estirpes semelhantes às estirpes de campo (LU et al., 1994).

6. CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho realizados em rebanhos de exploração de corte e leiteiros das regiões Nordeste e Centro-Oeste no Estado de São Paulo permitiram as seguintes conclusões:

1. A ocorrência de rotavírus em bezerros de exploração de corte e leite foi de 8,6%, o que indica a participação do agente na etiologia da diarreia dos bezerros.
2. A presença de infecção por rotavírus em 22% (29/132) dos bezerros com quadro clínico de diarreia indica uma associação estatística entre positividade e manifestação clínica de diarreia ($p < 0,01$).
3. A ocorrência de animais positivos sem sinais clínicos de diarreia (1,9%; 05/263) na população amostrada sugere a presença de portadores assintomáticos nos rebanhos e prováveis fontes de infecção para outros animais.
4. A maior frequência de rotavírus foi encontrada na faixa etária de 16 a 30 dias (13,8%), existindo uma associação estatística correlação entre a presença de rotavírus e a idade dos animais.
5. A análise do perfil eletroforético das estirpes de rotavírus identificou dois eletroforético distinto (A e B), com pouca diversidade genômica nos rebanhos estudados.
6. A caracterização genotípica das amostras por meio da técnica RT-*snm*PCR indicou ocorrência de infecções singulares por rotavírus, observando-se as associações dos genótipos G6P[5], G10P[5] e G?P[1].

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

ALFIERI, A. et al. RT-PCR for genotyping group A bovine rotavirus. **Virus Review & Research**, 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 poliemrase em cadeia. São Paulo, 134p. [Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo], 1999.

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

ALFIERI, A. A. et al. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Trop Anim Health Prod** 38, p. 521-526, 2006.

ALFIERI, A.A., ALFIERI, A. F., TAKIUCHI, E., LOBATO, Z. I. P., In: FLORES, E. et al. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: ufsm, 2007 p. 790.

* De acordo com:

NORMAS PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS / JABOTICABAL (www.fcav.unesp.br/medveterinaria/normasdiretrizes.php)

BARREIROS, M. A.B. et al. G and P genotypes from group A rotavirus detected in vaccinated cattle against NCDV rotavirus strain. **Virus Review & Research**, v.5, n.2, p.176, 2000.

BARREIROS, M. A.B. et al. 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.Medicine Series B**, Germany, n51 (3), p.104-109, 2004.

BEARDS, G.M., DESSELBERGER, V., FLEWETT, T.H. Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes, 1983-1988. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, n.27, p.2827-33, 1989.

BRIDGER, J. C. Novel rotaviruses in animals and man. Novel diarrhoea viroses. **In: CUBA FOUNDATION SIMPOSIUM**, 12, 1987, Proceeding. p.5-23.

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

BRITO, W. M. E. D. Caracterização sorológica e molecular de amostras de rotavírus bovino do Estado de Goiás. **Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP)**, São Paulo, SP, Brasil, 211pp.

BRITO, W. M. E. D. et al. 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 et al. 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. et al. Genotyping of group A bovine rotavirus by polymerase chain reaction (RT-PCR). **Virus Reviews & Research**, v.4 (suppl.1), p.59, 1999.

BUZINARO, M. G. et al. Study of bovine rotavirus from dairy herds in northern region of São Paulo State, Brazil. **Virus Reviews & Research**, São Lourenço, v.5, n.2, p.178, 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. et al. Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.**, v. 55, n. 3, p.266-270, 2003.

COSTATINI, V. et al. Group A bovine rotavirus: diagnosis and antigenic characterization of strains circulating in the Argentine Republic, 1994-1999. **Rev. Argent. Microbiol.** v.34, n.2, p.110-116, 2002.

DE LEEUW, P. W. et al. Rotavirus infection in calves in dairy herds. **Res. Vet. Sci.**, London, v.29, p.135-141, 1980.

ESTES, M.K., COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.53, p. 410-49, 1989.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N. et al. **Fields Virology**, Lippincott-Raven, Filadélfia, p.1625-1655, 1996.

ESTES, M. K. Rotaviruses. **Fields Virology**, Filadélfia, v. 4 p. 1747-1785, 2001.

FENNER, F. J.; WHITE, D. O. Other families of viruses. In: FENNER, F. J.; WHITE, D. O. **Medical Virology**. 2.ed. London: Academic Press, p406-425, 1976.

FALCONE, E. et al. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, dec. 1999, p. 3879-3882.

FIJTMAN, N.L. et al. Variations and persistency of eletropherotypes of bovine rotavirus field isolates. **Arch. Virol.**, Vienna, v.96, p.275-281, 1987.

FUKAI, K., et al. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. **Veterinary Microbiology**, n. 66, p.301-311, 1999.

FUKAI, k. et al. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 343-349, 2002.

FUKAI, K. et al. Molecular characteriazation of a novel bovine group A rotavirus. **Veterinary Microbiology** 123, p. 217-224, 2007.

GARAICOECHEA, L. et al. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10 year period (1994-2003). **Veterinary Microbiology**, n. 118, p. 1-11, 2006.

GERNA, G. et al. Isolation in Europe of 69-M-like (serotype 8) human rotavirus strains with either subgroup I or II specificity and a long RNA eletropherotype. **Arch. Virol.**, Vienna, v.112, p.27-40, 1990.

GOUVEA, V. et al. Polimerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.2, p.276-282, 1990.

GOUVEA, V. et al. Identification of bovine rotavirus G types by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, n.5, p.1338-1340, 1994.

HERRING, A. J. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, 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. detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3, and G11 in feces of diarrheic calves by using polimerase chain reaction – derived cDNA probes. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.2491-2496, 1993.

ISHIZAKI, H. et al. Persistence of a single eletropherotype 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.1019-24, 1995.

ISHIZAKI, H. et al. The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. **Veterinary Microbiology**, Amsterdan, v.48, p.367-72, 1996.

JEREZ, J. A. et al. Anticorpos anti-rotavírus em bovinos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.18, p.371-4, 1987a.

JEREZ, J. A. et al. Anticorpos anti-rotavírus em bovinos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.18, n.4, p. 371-374, 1987b.

JEREZ, J. A. et al. Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarréicas de bezerros. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.20, p. 257-7, 1989.

JEREZ, J. et al. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do Estado de São Paulo, **Brasil. Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.69, n.2, p.19-23, abr./jun., 2002.

KAPIKIAN, A. Z., CHANOCK, R. M. Rotaviruses. **In: FIELDS B. N. et al. Virology.** New York: Raven, 1990. P.1353-1403.

LUCCHELLI, A. et al. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **Am. J. Vet. Res.**, Shaumburg, v.53, n.2, p.169-74, 1992.

LU, W. et al. Serological and genotypic characterization of group A rotavirus reassortants from diarrheic calves born to dams vaccinated against rotavirus. **Vet. Microbiol.**, v.42, p.159-170, 1994.

MARTELLA, V. et al. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 8, p. 129-132, 2001.

MATTHIJNSSENS, J., RAHMAN, M., RANST, M. V. Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 2630-2635, 2008.

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

MENDES, V.M.C. et al. Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in south african calves. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 12, p. 3333-3335, 1993.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. **Microbiol. immunol.**, v.37, p.337-348, 1993.

PEREIRA, H. G. et al. Eletrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. **J. Hyg.**, Cambridge, v.80, p.117-25, 1983.

PEREIRA, H. G. et al. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **J. Virol. Methods**, Amsterdam, v.10, p. 21-8, 1985.

PEREIRA, M. G. Epidemiologia: teoria e prática. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 1995. 596p.

PONGSUWANNA, Y. et al. Scrological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **J. Clin. Microbiol.** 34, p. 1050-1057, 1996.

RAHMAN, M. et al., Genetic characterization of a Novel, Naturally Occurring Recombinant Human G6P[6] Rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, may; 41(5): p. 2088-2095, 2003.

REYNOLDS, D.J. et al. Microbiology of calf diarrhoea in souther Britain. **Vet. Rec.**, London, v.12, n.119, p.34-9, 1986.

SARAVANAN, M. et al. Genotyping of rotavirus of neonatal calves by nested-multiplex PCR in India. **Veterinarski ARHIV**, 76 (6), 497-505, 2006.

SATO, M. et al. Isolation of serotypes G8, P6[1] bovine rotavirus from adult cattle with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, p.1266-1268, 1997.

SNODGRASS, D.R. et al. Aetiology of diarrhoea in young calves. **Vet. Rec.**, London, v.12, n.119, p.31-4, 1986.

SNODGRASS, D.R. et al. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. **J. Clin. Microbiol.**,v.28, p. 504-507, 1990.

STEYER, A. et al. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. **Journal of General Virology**, 89, p. 1690-1698, 2008.

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.**, v.27, p.126-131, 1989.

TRUSFIELDS, M. Veterinary epidemiology. **Cambridge: Blackweel Science**, 1995. 429p.

TSUNEMITSU. H. et al. 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.

WOODE, G.N., BRIDGER, J.C. Viral enteritis of calves. **Vet. Rec.**, London, v.96, p.85-88, 1975.