

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ROTAVÍRUS EM
REBANHOS BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO NO
PERÍODO DE 2006 A 2010**

Heloisa Pinto de Godoy Siqueira

Médica Veterinária

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ROTAVÍRUS EM
REBANHOS BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO NO
PERÍODO DE 2006 A 2010**

Heloisa Pinto de Godoy Siqueira
Orientadora: Profa. Dra. Maria da Gloria Buzinaro

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

Siqueira, Heloisa Pinto de Godoy
S618e Epidemiologia molecular de rotavírus em rebanhos bovinos no
Estado de São Paulo no período de 2006 a 2010 / Heloisa Pinto de
Godoy Siqueira. -- Jaboticabal, 2015
ix, 63 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015
Orientadora: Maria da Gloria Buzinaro
Banca examinadora: Samir Issa Samara, Ricardo Luiz Moro de
Sousa
Bibliografia

1. Bezerros. 2. Brasil. 3. Diarreia. 4. distribuição espacial. 5. PAGE.
6. RT-PCR. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:616-036.22:636.2

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ROTAVÍRUS EM REBANHOS BOVINOS
NO ESTADO DE SÃO PAULO NO PERÍODO DE 2006 A 2010

AUTORA: HELOISA PINTO DE GODOY SIQUEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. MARIA DA GLORIA BUZINARO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA
VETERINÁRIA, Área: MEDICINA VETERINARIA PREVENTIVA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA DA GLORIA BUZINARO

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

Prof. Dr. SAMIR ISSA SAMARA

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

Prof. Dr. RICARDO LUIZ MORO DE SOUSA
Universidade de São Paulo / Pirassununga/SP

Data da realização: 23 de fevereiro de 2015.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HELOISA PINTO DE GODOY SIQUEIRA - nascida em 07 de junho de 1985, na Cidade de Cuiabá - MT, filha de Nicolau Pinto de Godoy Filho e Amélia Maria Sá de Godoy. Ingressou em junho de 2006 no Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), concluindo-o em dezembro de 2010. No primeiro semestre de 2011 foi bolsista de treinamento técnico científico do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), trabalhando com produção de gás *in vitro* para pequenos ruminantes, na mesma universidade de sua graduação. No ano seguinte se mudou para Jaboticabal e continuou como bolsista de treinamento técnico desta vez concedida pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) para trabalhar com análises e avaliações bromatológica na produção animal. Em março de 2013 iniciou o Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal (FCAVUNESP – Jaboticabal).

“Há pessoas que choram por saber
que as rosas têm espinho,
há outras que sorriem
por saber que os espinhos
têm rosas!”

Machado de Assis
(1839 – 1908)

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a minha mãe Amélia Maria Sá de Godoy por ser meu porto seguro, uma pessoa guerreira que mesmo sem ter tido a oportunidade de estudar, sempre me incentivou e nunca me deixei desistir de tentar, sempre com muita força e perseverança em todos os momentos, e ao meu pai Nicolau Pinto de Godoy Filho que sempre fez minhas vontades, desde levantar de madrugada para pegar um simples copo de água, como fazer “aquelas” super “gororobas” para sua filha faminta. Graças a vocês sou tudo o que posso ser hoje!!!

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus por sempre estar presente em minha vida, guiando meus passos e meus pensamentos.

A minha querida professora e orientadora Dr^a Maria da Gloria Buzinaro, por mesmo sem me conhecer meu deu a oportunidade de fazer o curso de mestrado, ter acreditado em mim, e sempre me dando muitos ensinamentos. Sou muita grata pela confiança, pela paciência e toda sabedoria, saiba que te admiro a cada dia mais.

Ao meu marido André Buzutti de Siqueira que sempre teve muita paciência comigo, me ajudando nos momentos mais difíceis estando sempre ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Samir Issa Samara pelas correções feitas na banca de qualificação e defesa, muito obrigada!

A Dr^a Daniela Gomes pelas sugestões na banca de qualificação.

Ao Prof. Dr. Luis Antonio Mathias pelas ajudas com a estatística desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Moro pelas contribuições no dia da defesa.

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

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva por serem acolhedores comigo fazendo com que eu sinta a vontade de estar aqui todos os dias.

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

As minhas amigas, Renata Ferreira dos Santos e Glaucenyra Cecília Pinheiro pelas dicas nas construções dos mapas, formatações textuais, em parte das análises estatística e ter sido companheira nos piores momentos e sem nunca ter abandonado o barco.

As minhas amigas, Denise, Roberta e Gislaine Raquel que sempre estavam com um sorriso no rosto e foram responsáveis pelos momentos de distração.

Aos meus pais Nicolau e Amélia que me ensinaram tudo o que sou hoje.

Ao meu irmão Paulo e minha cunhada Débora por serem presentes em minha vida, dando conselhos, traduzindo textos e me amando muito.

A minha irmã Fernanda e meu cunhado Sérgio que sempre acreditaram em mim, que ao chegar em casa sempre me esperavam com aquela super picanha!!

Aos anjinhos da minha vida Bruno Fernando, Luiz Felipe e André Fernando que são a minha alegria.

Ao meu sogro João Bosco e minha sogra Maria Aparecia que sempre nos ajudou no momento de dureza, sempre mandando uns trocadinhos.

A minha Tia Cássia que se enche de orgulho em falar que tem uma sobrinha estudando na Unesp, fazendo que eu me sinta motivada.

A minha prima Sílvia Thaís pela companhia em todas as fases da minha vida, apesar de não sermos irmãs de sangue, tenho a como irmã de coração.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT.	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Considerações Gerais.....	4
3.2 Patogenia	8
3.3 Métodos de diagnóstico	9
3.4 Ocorrências de rotavírus em rebanhos bovinos.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1 Área de estudo.....	14
4.2 Obtenção dos dados	15
4.3 Amostras de fezes	16
4.4 Pesquisa de rotavírus nas amostras de fezes por meio da técnica de PAGE .	16
4.4.1 Suspensão fecal	16
4.4.2 Extração do RNA viral, preparo e coloração do gel de poliacrilamida	16
4.5 Amostra padrão de Rotavírus	17
4.6 Determinação do perfil eletroforético do genoma de rotavírus pela técnica de PAGE	17
4.7 Genotipagem das amostras positivas pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	18
4.7.1 Extração do RNA dupla fita (dsRNA) de rotavírus bovino.....	18
4.7.2 Síntese do cDNA e reação em cadeia da polimerase.....	19
4.7.3 Multiplex “semi-nested” RT-PCR	19
4.8 Análise estatística	21

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Detecção de rotavírus nas amostras de fezes por meio técnica de PAGE	22
5.1.1 Caracterização de positividade e local de origem dos rebanhos bovinos ..	23
5.1.2 Caracterização da positividade conforme a idade	28
5.2 Análise do perfil eletroforético do genoma de rotavírus pela técnica de PAGE	31
5.3 Distribuição temporal de rotavírus no período de 2006 a 2010	36
5.4 Caracterização dos genótipos G (VP7) e P (VP4) pela RT-PCR	38
6. CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8. APÊNDICES	56



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL



CEBEA – COMISSÃO DE ÉTICA E BEM ESTAR ANIMAL

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 009013-08 do trabalho de pesquisa intitulado **“Caracterização molecular de estirpes de rotavirus em rebanhos bovinos leiteiros e de corte das regiões nordeste e centro-oeste do estado de São Paulo”**, sob a responsabilidade do Prof^a Dr^a Maria da Glória 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 E BEM ESTAR ANIMAL (CEBEA), em reunião ordinária de 7 de maio de 2008.

Jaboticabal, 08 de maio de 2008.


Prof. Dr. Marcos Lânia de Araújo
Presidente - CEBEA


Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEBEA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 003770/10 do trabalho de pesquisa intitulado **"Ocorrência e diversidade molecular de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros e de corte nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil"**, sob a responsabilidade da Profª Drª Maria da Glória 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 10 de março de 2010.

Jaboticabal, 10 de março de 2010.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ROTAVÍRUS EM REBANHOS BOVINOS NO ESTADO DE SÃO PAULO NO PERÍODO DE 2006 A 2010

RESUMO- Os rotavírus são os principais agentes causadores de diarreias em várias espécies animais e nos seres humanos, causando grandes prejuízos econômicos e de saúde pública. Uma característica marcante desse vírus é a grande diversidade genotípica das estirpes circulantes. Informações sobre genotipagem são imprescindíveis para estabelecer mecanismos de vigilância epidemiológica da infecção por rotavírus. O presente trabalho teve como objetivo discutir a epidemiologia de rotavírus na espécie bovina por meio de estudos desenvolvidos entre os anos 2006 e 2010, no Laboratório de Rotavirose da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/Unesp). Foram obtidas 803 amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 90 dias, com e sem diarreia, de 48 rebanhos de gado bovino leiteiro e de corte localizados no Estado de São Paulo. As amostras foram caracterizadas com base nos testes de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O teste de PAGE indicou animais positivos em 33,3% (16/48) dos rebanhos e 6,1% (49/803) das amostras analisadas. Nos rebanhos leiteiros foram detectados animais infectados por rotavírus nas diferentes faixas etárias de até 90 dias de idade, enquanto nos rebanhos de corte alta frequência (22,8%) de amostras positivas foi verificada em bezerros entre 1 e 15 dias ($P < 0,05$). A análise do perfil do genoma no PAGE identificou sete eletroferótipos, característicos de rotavírus do grupo A, indicando grande diversidade genômica do rotavírus nos rebanhos estudados. A caracterização molecular dos genótipos G (VP7) e P (VP4) pela RT-PCR identificou o genótipo G6P[5] como o mais comum. Foram construídos mapas que analisaram a distribuição espacial dos rotavírus detectados. O trabalho de identificação do rotavírus é de grande valia, uma vez que fica evidenciado que o agente encontra-se disseminado em várias localidades do país que apresentam características ambientais e formas de produção distintas.

Palavra-chave: bezerros, Brasil, diarreia, distribuição espacial, PAGE, RT-PCR

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF ROTAVIRUS IN CATTLE SHEEP IN SÃO PAULO STATE IN THE PERIOD 2006 TO 2010

ABSTRACT- Rotavirus is the major causative agent of diarrhea in several animal species and humans, causing large economic and public health damage. A striking feature of this virus is the great genotypic diversity of circulating strains. Genotyping information is essential to establish surveillance mechanisms of rotavirus infection. This study aimed to discuss the epidemiology of rotavirus in cattle through studies conducted between 2006 and 2010, the Rotavirus Disease Laboratory of the Faculty of Agriculture and Veterinary Sciences of the Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" (FCAV / UNESP), 803 samples of feces of calves were obtained, ranging in age from 1 to 90 days, with and without diarrhea, 48 herds of dairy and beef cattle in the State of São Paulo. The samples were characterized on the basis of electrophoresis tests on polyacrylamide gel (PAGE) and then reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The PAGE test indicated positive animals in 33.3% (16/48) of the herds and 6.1% (49/803) of the samples. In dairy herds infected animals were detected rotavirus in different age groups ($P > 0.05$), while in the high frequency cut herds (22.8%) of positive samples was observed in calves between 1 to 15 days ($P < 0.05$). The genome profile analysis in PAGE identified seven electropherotypes characteristic of rotavirus group A, indicating a high genomic diversity of rotavirus in the herds. The molecular characterization of genotype G (VP7) and P (VP4) by RT-PCR identified the genotype G6P [5] as the most common. Maps were constructed to analyze the spatial distribution of detected rotavirus. Rotavirus identification work is of great value, since it is evident that different genotypes agent is spread in São Paulo presenting different forms of production.

Keywords - calves, Brazil, diarrhea, spatial distribution, PAGE, RT-PCR

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Triagem para detecção rotavírus pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em amostras de fezes de bezerros, entre 1 e 90 dias de idade, de gado leiteiro e de corte do Estado de São Paulo, no período de 2006 a 2010.	22
Tabela 2. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros pelo teste de eletroforese em gel de poliacrilamida na faixa etária de 1 a 90 dias, de gado leiteiro com e sem diarreia no Estado de São Paulo, colhidas entre 2006 e 2010.	26
Tabela 3. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros pelo teste de eletroforese em gel de poliacrilamida na faixa etária de 1 a 90 dias, de gado de corte, com e sem diarreia no Estado de São Paulo, colhidas entre 2006 e 2010.	26
Tabela 4. Amostras positivas para rotavírus na eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo a faixa etária dos animais e a consistência das fezes, em rebanhos bovinos leiteiros no Estado de São Paulo, colhidas entre 2006 e 2010.	28
Tabela 5. Amostras positivas para rotavírus na eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo a faixa etária dos animais e a consistência das fezes, em rebanhos bovinos de corte no Estado de São Paulo, colhidas entre 2006 e 2010.	30
Tabela 6. Tipos eletroforéticos de rotavírus bovino distribuídos segundo os municípios e os rebanhos de origem, em bezerros de gado leiteiro do Estado de São Paulo, no período de 2006 a 2010.	33
Tabela 7. Tipos eletroforéticos de rotavírus bovino distribuídos segundo os municípios e os rebanhos de origem, em bezerros de rebanhos de gado de corte do Estado de São Paulo, no período de 2006 a 2010.	33
Tabela 8. Distribuição temporal de rotavírus em bezerros de rebanhos bovinos leiteiros e de corte, com e sem diarreia, do Estado de São Paulo, coletadas entre 2006 e 2010.	36
Tabela 9. Resultados da genotipagem G (VP7) e P (VP4) de rotavírus em amostras de fezes de bovinos leiteiros e de corte no Estado de São Paulo pela reação em cadeia da polimerase, entre 2006 e 2010.	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama esquemático da partícula de rotavírus identificando os 11 segmentos do genoma viral e as respectivas proteínas codificadas (adaptado de Gentsch et al., 2005).	7
Figura 2. Divisões geográficas com os municípios do Estado de São Paulo, Brasil, onde encontravam-se os rebanhos estudados para detecção de rotavírus, entre 2006 e 2010.	15
Figura 3. Divisões geográficas do Estado de São Paulo destacando os municípios onde estão localizados os rebanhos de gado leiteiro (A) e de corte (B) com amostras positivas para rotavírus, colhidas entre 2006 e 2010.	27
Figura 4. Perfil eletroforético do genoma de rotavírus detectado em bezerros de rebanhos de corte no Estado de São Paulo, em comparação com a amostra padrão NCDV.	34
Figura 5. Perfil eletroforético do genoma de rotavírus detectado em bezerros de rebanhos de corte no Estado de São Paulo, em comparação com a amostra padrão NCDV.	35
Figura 6. Distribuição temporal de rotavírus conforme o total de amostras analisadas em bezerros do Estado de São Paulo, entre 2006 e 2010.	37
Figura 7. Distribuição temporal das amostras positivas para rotavírus em bezerros de rebanhos leiteiros e de corte no Estado de São Paulo, entre 2006 e 2010.	38
Figura 8. Frequência dos genótipos G e P de rotavírus caracterizada pela reação em cadeia da polimerase em rebanhos bovinos do Estado de São Paulo, no período de 2006 a 2009. (A) gado leiteiro. (B) gado de corte.	40
Figura 9. Produtos da genotipagem G de rotavírus pela RT-PCR de amostras de campo e referência. Linha M, marcador de peso molecular (100 pb); linha A, estirpe de referência de rotavírus grupo A (NCDV); linhas B, C, D, E, F (G6) e linha G (G10).	41

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Classificação da família <i>Reoviridae</i> de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus - ICTV (2013), com destaque para o gênero <i>Rotavirus</i> .	5
Quadro 2. Projetos de pesquisa desenvolvidos no Laboratório de Rotavirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, entre 2006 e 2010.	14
Quadro 3. Sequência de bases dos ' <i>primers</i> ' utilizados para a genotipagem G (VP7) e P (VP4) de rotavírus bovino.	20

1. INTRODUÇÃO

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

A diarreia neonatal é uma das doenças mais frequentes dos bezerros e a principal causa de perdas econômicas devido a morbidade e mortalidade. Caracterizada como uma síndrome complexa, a doença é desencadeada pela interação de vários fatores entre os quais estão a imunidade, a genética, o ambiente, a nutrição e a infecção por microrganismos patogênicos. Os principais agentes envolvidos nessa síndrome podem ser de origem bacteriana, parasitária e viral, isolados ou em associação, muitos dos quais com potencial zoonótico, causando distúrbios entéricos nos seres humanos. Dentre os agentes de origem viral, o rotavírus assume papel importante, apresentando como característica marcante a alta resistência da partícula viral, facilidade de transmissão entre os animais infectados, grande diversidade genética das amostras de campo, além da capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros, dificultando o controle da enfermidade e, ainda, com consequências na saúde pública.

Em todo o mundo, focos de diarreias em bezerros tem como causa principal o rotavírus do grupo A, com maior frequência de diagnóstico em animais com até 30 dias de idade. No Brasil, as pesquisas também apontam o rotavírus como agente importante das diarreias nos bezerros, com casos relatados e diagnósticos comprovados nos Estados do Espírito Santo, São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul.

Dada à importância desse agente viral, as pesquisas tem mostrado que se torna imprescindível estudos epidemiológicos que investiguem a participação do rotavírus na etiologia das diarreias nos bovinos e das variáveis envolvidas com a

infecção e manutenção do agente nos rebanhos para a tomada de medidas profiláticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O estudo propôs avaliar a ocorrência de infecção por rotavírus em rebanhos de gado leiteiro e de corte no Estado de São Paulo entre 2006 a 2010.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a frequência de infecção por rotavírus em bezerros de rebanhos de gado leiteiro e de corte, por meio da técnica de PAGE, no período de 2006 a 2010.
- Verificar a distribuição de rotavírus em bovinos de acordo com a consistência das fezes (com e sem quadro clínico de diarreia) e a faixa etária dos animais nos rebanhos estudados.
- Caracterizar o perfil eletroforético do genoma de rotavírus identificados nas amostras positivas, por meio da técnica de PAGE.
- Analisar a classificação molecular dos genótipos G e P de rotavírus bovino identificados ao longo do estudo por meio da técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR).
- Determinar a distribuição temporal dos casos positivos para rotavírus nos rebanhos estudados, no período de 2006 a 2010.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Considerações Gerais

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

Embora um grande número de agentes etiológicos estão envolvidos neste quadro clínico, os rotavírus são considerados a causa mais comum de diarreia grave, antes do desenvolvimento da imunidade ativa (DHAMA et al., 2009).

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

Os rotavírus estão classificados dentro da família *Reoviridae* e gênero *Rotavirus* e, de acordo o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), foi proposto a classificação dos rotavírus em cinco espécies, diferenciadas pelas letras A, B, C, D e E (Quadro 1) (ICTV, 2013). A partícula viral apresenta um formato icosaédrico, não envelopado com diâmetro de 75 nm, constituído por três camadas proteicas, designadas como capsídeo externo, capsídeo intermediário e core.

Quadro 1- Classificação da família *Reoviridae* de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus - ICTV (2013), com destaque para o gênero *Rotavirus*.

Família Reoviridae	Subfamília	Gênero	Espécie	Infecta
	Sedoreovirinae	<i>Cardoreovirus</i>	<i>Eriocheir sinensis reovirus</i>	Animais
		<i>Mimoreovirus</i>	<i>Micromonas pusilla reovirus</i>	Bactérias
		<i>Orbivirus</i>	<i>Bluetongue virus</i>	Animais
		<i>Phytoreovirus</i>	<i>Wound tumor virus</i>	Plantas
			Rotavirus A	
			Rotavirus B	
		Rotavirus	Rotavirus C	Animais e humanos
			Rotavirus D	
			Rotavirus E	
		<i>Seadornavirus</i>	<i>Banna virus</i>	Animais
	Spinareovirinae	<i>Aquareovirus</i>	<i>Aquareovirus A</i>	Animais
		<i>Coltivirus</i>	<i>Colorado tick fever vírus</i>	Animais
		<i>Cypovirus</i>	<i>Cypovirus 1</i>	Insetos
		<i>Dinovernavirus</i>	<i>Aedes pseudoscutellaris reovirus</i>	Insetos
		<i>Fijivirus</i>	<i>Fiji disease vírus</i>	Plantas
		<i>Idnoreovirus</i>	<i>Idnoreovirus 1</i>	Insetos
		<i>Mycoreovirus</i>	<i>Mycoreovirus 1</i>	Animais
		<i>Orthoreovirus</i>	<i>Mammalian orthoreovirus</i>	Animais e humanos
		<i>Oryzavirus</i>	<i>Rice ragged stunt virus</i>	Plantas

O genoma viral é constituído por 11 segmentos de dupla fita de RNA (dsRNA), sendo que cada segmento genômico codifica pelo menos uma proteína, das quais seis são proteínas estruturais (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6, VP7) e seis não estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) (Figura 1) (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O “core” é formado pelas proteínas VP1, VP2 e VP3. A proteína VP2 é codificada pelo segmento 2 e está envolvido na organização do genoma viral. As proteínas VP1 (codificada pelo seguimento 1) e VP3 (codificada pelo segmento 3) estão associados ao genoma viral e apresentam atividades de polimerase (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O capsídeo intermediário, formado pela proteína VP6 e codificado pelo segmento 6 possui elevado potencial antigênico e imunogênico. Esta proteína contém determinantes antigênicos de grupo e subgrupo e não induz a produção de

anticorpos neutralizantes, mas é provável que atue na indução de imunidade celular (VAN REGENMORTEL et. al., 2000).

As proteínas que compõem o capsídeo externo são a VP4 e VP7. A proteína VP4 é codificada pelo quarto segmento do genoma viral. Ela é clivada por enzimas proteolíticas em dois polipeptídeos menores VP5* e VP8* e forma juntamente com a VP7 o capsídeo externo do rotavírus, sendo responsável pela ligação dos rotavírus aos enterócitos. A proteína VP7 é codificada pelos segmentos 7, 8, ou 9 dependendo da estirpe viral. Esta proteína é considerada altamente imunogênica e induz a produção de anticorpos neutralizantes específicos e contém antígenos para sorotipos e genótipos de rotavírus do grupo A. Nesse sistema, a proteína VP4 é referida como antígeno P (protease-sensível), e a proteína VP7 como antígeno G (glicoproteína) (ESTES, 2001).

Pelo menos 35 genótipos P distintos já foram descritos (MIÑO et al., 2013), sendo os genótipos P[1] (NCDV), P[5] (UK) e P[11] (B223) frequentemente associados à rotavirose bovina (PAPP et al., 2013). Em humanos, seis diferentes genótipos foram relatados, sendo denominados P[8] (Wa), P[4] (DS1), P[6] (M37), P[9] (k8), P[10] (69M) (ESTES; COHEN, 1989), e P[12] (GOUVEA et al., 1994; STEELE; VAN NIEKERK; MPHALELE, 1995). Outros genótipos P importantes para animais são P[6] (OSU) e P[7] (GOTTFRIED), encontrados em suínos, destacando-se ainda os genótipos P[1] e P[2] (SA11), P[3] (RRV), ambos vírus símios, e em equinos, a estirpe H2 (GOUVEA et al., 1994).

No que se refere aos genótipos G, foram descritos 27 genótipos (G1 - G27) (MATTHIJNSSENS et al., 2011; MIYAZAKI et al., 2011). Destes, G6, G8, e G10 em associação com P[1], P[5], P[11], P[15] e P[21] são considerados epidemiologicamente relevantes para a espécie bovina (SNODGRASS et al., 1986, ISHIZAKI et al., 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2007; MARTELLA et al., 2010), enquanto estirpes pertencentes a G1 – G3, G5 e G11 e P[3], P[6] e P[14] são detectadas esporadicamente.

Nos seres humanos, foram identificados os sorotipos G1 a G4, G6, G8, G9 e G12 (GERNA et al., 1990; ITURRIZA-GÓMARA; KANG; GRAY, 2004.; YAMAMOTO et al., 2011). O sorotipo G5 foi identificado em suínos, equinos e bovinos, enquanto G7 e G11 foram relatados em aves e suínos, respectivamente (HOSHINO;

KAPIKIAN, 1994). Posteriormente, foram descritos novos sorotipos identificados em equinos (G13 e G14) (BROWING et al., 1991; MONINI et al., 2011) e em bovinos (G15, G21 e G24) (RAHMAN et al., 2003; ABE et al., 2011).

As proteínas não estruturais NSP1 (codificada pelo segmento 5), NSP2 (codificada pelo segmento 7, 8 ou 9), NSP3 (codificada pelo segmento 7, 8 ou 9), NSP5 e NSP6 (codificadas pelo segmento 11), estão envolvidas na replicação viral e interagem com o ácido nucleico. A NSP4 (codificada pelo segmento 10) é uma glicoproteína transmembrana, localizada especificamente no retículo endoplasmático (RE) e desempenha importante papel na morfogênese e patogênese viral. Estudos realizados em camundongos caracterizam tal proteína como a primeira enterotoxina viral (DEEPA; RAO; SUGUNA, 2007; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

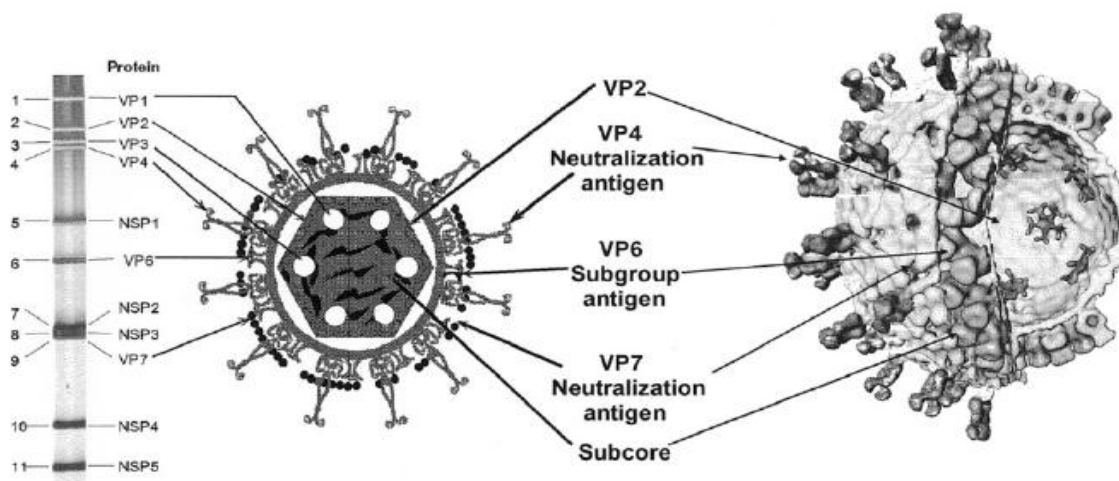


Figura 1- Diagrama esquemático da partícula de rotavírus identificando os 11 segmentos do genoma viral e as respectivas proteínas codificadas (adaptado de Gentsch et al., 2005).

Um sistema adotado para a classificação de amostras dos rotavírus baseia-se na análise de padrão eletroforético de migração de segmentos genômicos, no gel de poliacrilamida, pois são os únicos vírus conhecidos de mamíferos e aves que possuem 11 segmentos de RNA. A extensão de cada um dos 11 segmentos varia entre 667 e 3.302 pb e o genoma completo apresenta aproximadamente 18.600 pb. É essa diferença de tamanho que possibilita que os segmentos genômicos apresentem perfil de migração característico e único para os rotavírus quando separados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Com base nos perfis

eletroforéticos, foram definidos sete grupos denominados de “A” a “G” dentre estes, os rotavírus do grupo “A” são os mais prevalentes (LUCCHELLI et al., 1992).

Por esses vírus apresentarem ausência de envelope glicoproteico, sua resistência as condições ambientais são elevadas (WHO, 2006), permanecendo viáveis por cerca de 60 dias em esgoto comum, ou até mesmo infectante em temperaturas de até 50°C (FAUQUET et al., 2005). Estudos demonstram que a infectividade dos rotavírus pode ser mantida por um longo período de tempo (aproximadamente 32 meses) a 10°C em fezes, tornando preocupante a possibilidade de serem veiculados pelos efluentes não tratados, e como consequência, disseminarem-se para outras espécies (RAMOS et al., 2000). Para inativação dos vírus, podem ser usados desinfetantes tais como fenol, formalina, cloro e betapropiolona; o etanol 95% é um dos desinfetantes mais eficazes, pois remove o capsídeo externo (KAPIKIAN et al., 1986).

Os rotavírus são predominantemente espécie-específicos, porém infecções heterólogas também são relatadas com relativa frequência. Essas infecções são caracterizadas pela infecção de uma determinada espécie animal por um rotavírus de outra espécie, como as de seres humanos causadas por genótipos de rotavírus de suínos e bovinos e vice – versa. O que exemplifica o caráter zoonótico da doença que esta cada vez mais presente nos isolados virais identificados em humanos. Estudos realizados na Eslovênia e na Bélgica evidenciaram a transmissão interespecies de estirpes de rotavírus humano, suíno e bovino (STEYER et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2008).

3.2 Patogenia

A transmissão dos rotavírus ocorre principalmente pela via fecal-oral com a ingestão de fezes ou alimentos contaminados, atingindo a luz intestinal e infectando os enterócitos maduros das vilosidades do intestino delgado de animais e de humanos, em especial, nas regiões do duodeno e jejuno. A liberação de novas partículas ocorre após a destruição das células epiteliais, causando atrofia das vilosidades intestinais e hipertrofia das criptas. Após o rompimento das células, uma

grande quantidade de vírus são liberados para o lúmen intestinal, sendo excretados nas fezes (COOK et al., 2004).

Estudos experimentais com estirpes homólogas e heterólogas de rotavírus revelaram que o agente quando recombinates pode causar viremia e infecções extraintestinais. Após a destruição dos enterócitos e exposição da membrana basal, o rotavírus atinge a corrente circulatória e alcança outros órgão como fígado, pulmões, líquido cefalorraquidiano e plexo coróide, podendo desempenhar um fator predisponente para infecções bacterianas secundárias. Estas descobertas podem fornecer novas perspectivas sobre a patogênese de doenças respiratórias em bovinos (KIM et al., 2011).

O mecanismo de produção da diarreia por rotavírus é ocasionado 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 ao acúmulo de dissacarídeos na luz intestinal, fatores considerados importantes na patogenia da doença (KAPIKIAN; CHANOCK, 1990).

A maior suscetibilidade dos animais neonatos é explicada pelo fato de a reposição do epitélio apical das vilosidades intestinais ocorrer de forma mais lenta, facilitando o desenvolvimento completo do ciclo replicativo e a produção viral. Os animais adultos tornam-se resistentes à doença porque a reposição dos enterócitos é mais intensa e compete com a replicação viral, de forma que somente as estirpes virais muito virulentas podem causar diarreia em bezerros com idade superior a seis semanas. A doença clínica também não é frequente na primeira semana de vida do animal, provavelmente pela transmissão passiva dos anticorpos maternos e consequentemente a neutralização do vírus (CRAWFORD et al., 2006).

3.3 Métodos de diagnóstico

As manifestações que os rotavírus desencadeiam não geram sinais característicos e específicos para que se possam concluir um diagnóstico apenas pela sintomatologia, uma vez que outras infecções virais também podem gerar quadros semelhantes, por isso a necessidade de um diagnóstico laboratorial. Uma

das características dos rotavírus é a grande quantidade de partículas virais eliminadas nas fezes o que facilita a detecção do vírus (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A primeira técnica utilizada foi amicroscopia eletrônica que possibilitou o diagnóstico direto do vírus, identificando a partícula nas amostras de fezes de crianças com gastroenterite. Porém, a utilização desta técnica na rotina laboratorial se torna inviável quando se tem um grande número de amostras, além da necessidade de ter pessoal qualificado (BRANDT et al., 1981).

Outra técnica bastante utilizada é a detecção do antígeno viral com uso de anticorpos policlonais pelo ensaio imunoenzimático (ELISA), disponível comercialmente na forma de “kits” que permite o uso em laboratórios de rotina com facilidade de se testar varias amostras simultaneamente (PEREIRA et al., 1985).

Dos vários métodos disponíveis para detectar rotavírus nas fezes, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamia (PAGE) tem apresentado grande especificidade analítica, e é a técnica mais utilizada para o diagnóstico da rotavirose. 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 estirpes prevalentes 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).

O uso da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) precedido por transcrição reversa (RT-PCR) é indispensável quando se quer monitorar os genótipos de rotavírus envolvidos em diarreias. O resultado quando associado com importantes informações epidemiológicas, como distribuição sazonal dos genótipos, co-circulação de diferentes genótipos, frequência de infecções mistas, determinação de estirpes de genótipos não identificados e novos genótipos. Considerando-se que os rotavírus apresentam distribuição mundial e grande diversidade de hospedeiros, o monitoramento também fornece dados relativos à caracterização de infecções interespecies (CONNER; MATSON; ESTES, 1994).

3.4 Ocorrências de rotavírus em rebanhos bovinos

A importância do rotavírus na etiologia da diarreia em bovinos tem sido relatada em vários países. Estudos realizados nos EUA (THEIL; McCLOSKEY, 1989), Canadá (McNULTY; LOGAN, 1983), África do Sul (COSTA MENDES et al., 1993), Argentina (BELLINZONI et al., 1987) e Holanda (DE LEEUW et al., 1980), registraram a presença do rotavírus em fezes diarreicas de bezerros em 22%, 58%, 42%, 53% e 44,5% respectivamente.

Mesmo com o passar dos anos, o agente continua sendo muito importante para a bovinocultura mundial.

Garcia et al. (2000), avaliaram a importância de infecções clínicas por rotavírus durante surto de diarreia em bezerros de rebanhos leiteiros na Espanha. Os pesquisadores determinaram que a infecção ocorria em diferentes faixas etárias, com maior incidência em animais com 1 a 14 dias de idade.

No México, em estudo realizado por Limas et al. (2009), foram analisadas 128 amostras de bezerros com diarreia, em 26 propriedades leiteiras e de corte. As amostras foram examinadas por RT-PCR e os resultados indicaram 9,37% de positividade para rotavírus, com três diferentes genótipos nos rebanhos estudados, G10P[11] (67%), G6P[5] (25%) e G10P[5] (8%).

Abe et al. (2009) investigaram a presença de rotavírus em 171 amostras de fezes de bezerros de rebanhos de corte no Japão. Por meio da técnica de RT-PCR, foi identificada a positividade de 5,3% (9/171). A análise de sequências parciais dos genes VP4 e VP7 indicou que a maioria das amostras pertencia ao genótipo G10P[11].

Em rebanhos da Austrália, Swiatek et al. (2010) analisaram 100 amostras de fezes de bezerros, com e sem diarreia, detectando 26% de positividade para rotavírus pelo ensaio imunoenzimático e PAGE. A caracterização genotípica identificou os genótipos G6P[5] e G6P[5+11] como os mais prevalentes. Os genótipos G10P[11], G6G10P[5] e G6G10P[11] também foram identificados.

Na China, Wei et al. (2013) investigaram as características epidemiológicas e a distribuição genotípica de rotavírus bovino em 195 amostras de fezes de bezerros com diarreia. Os autores encontraram 41,05% de amostras positivas pelo ensaio

imunoenzimático. A caracterização molecular das amostras positivas pela RT-PCR indicou maior incidência do genótipo G6P[5], seguido de G6P[5+11], G10P[5+11] e G6G10P[5].

A detecção de rotavírus causando infecções em rebanhos no Brasil tem sido estudada por vários pesquisadores.

Os primeiros relatos da infecção por rotavírus em bezerros no Brasil foram feitos por Jerez et al. (1987a) quando pesquisavam amostras de fezes de bezerros, e identificaram o rotavírus pela técnica de ensaio imunoenzimático em 20% dos animais com até 30 dias de idade. Em outro estudo, Jerez et al. (1987b) observaram que em 120 amostras fecais de bezerros, de diversas raças, com até 30 dias de idade, no Estado de São Paulo foram detectados 35 (29%) casos positivos.

Posteriormente, Barbosa et al. (1998) pesquisaram rotavírus em bezerros de rebanhos leiteiros em propriedades de Pará de Minas, no Estado de Minas Gerais. Foram colhidas 194 amostras de fezes, de animais com idade entre 2 e 6 dias. Para o diagnóstico foi utilizado a técnica de ELISA com anticorpo monoclonal, os resultados indicaram 57,6% (19/33) de rebanhos positivos e 33 (17%) amostras positivas para rotavírus.

No Estado de São Paulo, Buzinaro; Freitas (2002), realizaram um estudo para determinar a ocorrência de infecção para rotavírus em rebanhos leiteiros. Foram analisados, por meio do PAGE, 576 amostras de fezes de animais entre 1 e 45 dias, colhidas de 63 rebanhos. Dentre as amostras, 28 (4,9%) foram positivas, sendo 22 (78,6%) delas com diarreias e 6 (21,4%) sem diarreia.

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

Em outro estudo, Alfieri et al. (2006) determinaram a frequência de infecção por rotavírus em rebanhos leiteiros e de corte de sete estados brasileiros. Rotavírus do grupo A foi detectado pelo PAGE em 19,4% das amostras analisadas. Nos

rebanhos de corte, foi detectada a maior frequência de infecção (22,9%) quando comparados com o gado leiteiro (16,4%).

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

No Estado de Goiás, Caruzo et al. (2010) estudaram a ocorrência de rotavírus em uma propriedade leiteira, colhendo 331 amostras de fezes de bezerros com menos de um mês de idade. Pela técnica de PAGE e ensaio imunoenzimático, encontraram 33 (9,9%) amostras positivas para rotavírus, que foram genotipadas em G6P [1] (6,06%), G10P [11] (9,09%) e G6P [11] (15,15%). A maioria das amostras (51,6%) apresentou vários genótipos P, incluindo genótipos humanos típicos P [4] e P [6], sugerindo a ocorrência de co-infecções e de rearranjo genético.

Freitas et al. (2011) avaliaram a prevalência da infecção por rotavírus em bezerros, em uma região produtora de leite do Estado de São Paulo. Foram colhidas 404 amostras de fezes de animais que apresentavam diarreia ou não. Pela técnica do ensaio imunoenzimático e PAGE, observaram uma prevalência de 6,7%, sendo 18,4% e 2,7% em amostras com diarreia e sem diarreia, respectivamente.

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

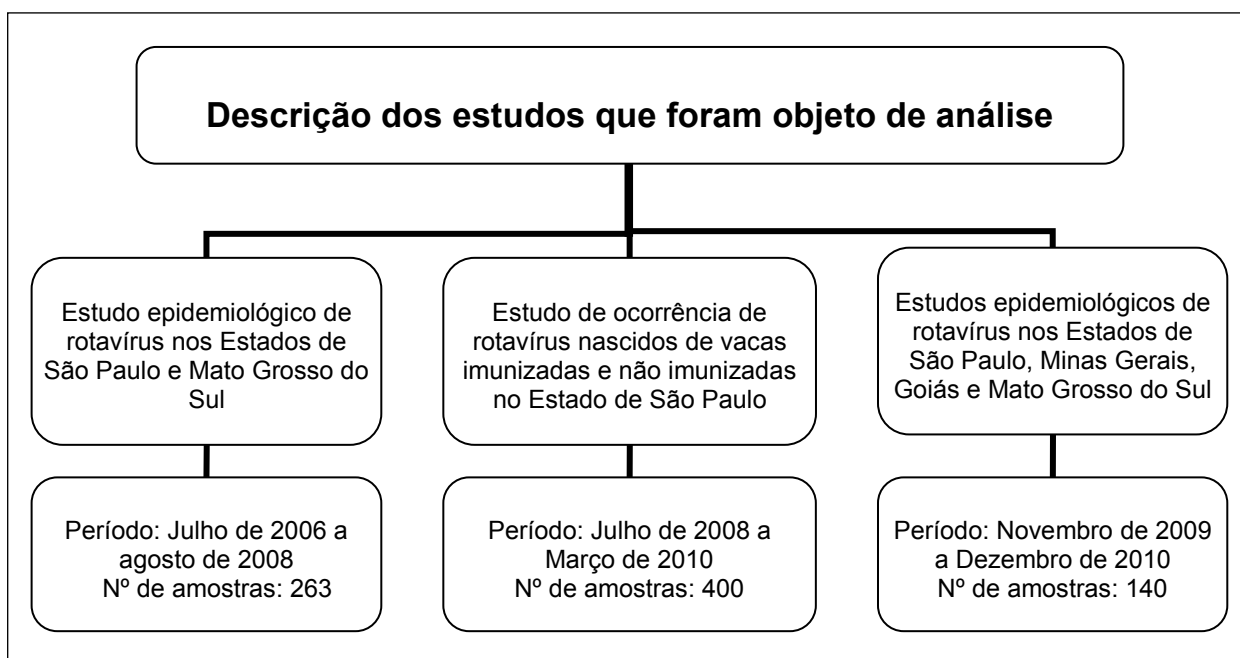
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo

Para a realização deste trabalho foram incluídos dados de projetos de pesquisa sobre estudos epidemiológicos de rotavírus em rebanhos bovinos desenvolvidos no Laboratório de Rotavirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - Unesp, entre os anos de 2006 e 2010.

No Quadro 2 encontram-se relacionados os projetos de pesquisa que fizeram parte deste levantamento.

Quadro 2. Projetos de pesquisa desenvolvidos no Laboratório de Rotavirose do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV/Unesp, entre 2006 e 2010.



Foram amostrados 48 rebanhos bovinos, sendo 35 rebanhos de gado leiteiro e 13 de gado de corte, provenientes de 21 municípios (Figura 2) do Estado de São Paulo.

Em termos climáticos, o Estado possui um clima caracterizado como tropical semi - úmido com duas estações bem definidas: um verão quente, úmido e chuvoso e um inverno ameno e seco.

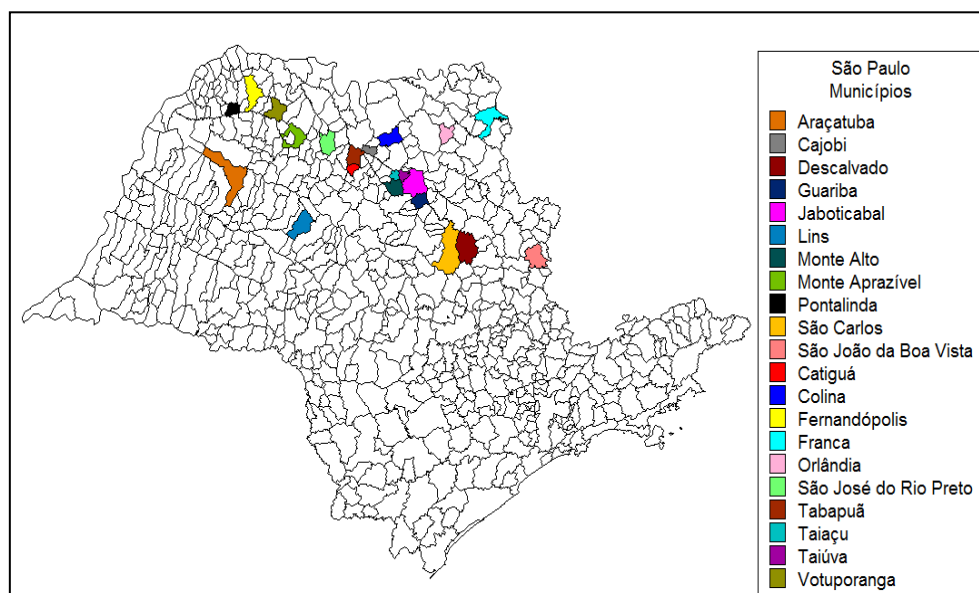


Figura 2. Divisões geográfica com os municípios do Estado do São Paulo, Brasil, onde encontravam-se os rebanhos estudados para detecção de rotavírus, entre 2006 e 2010.

4.2 Obtenção dos dados

Neste estudo, foram obtidos dados do caderno de registro do Laboratório de Rotavirose da FCAV/Unesp – Câmpus de Jaboticabal. O caderno é o documento oficial do laboratório e foi utilizado rotineiramente para consulta dos resultados dos projetos de pesquisa que foram a base deste trabalho de dissertação de mestrado.

Foram obtidas informações sobre a espécie animal, idade, sexo, consistência das fezes (com diarreia ou não), data da colheita, categoria do animal (leiteiro ou corte), além de informações sobre a procedência do animal (Estado e município). O protocolo das técnicas e os resultados dos testes de laboratório para a pesquisa de rotavírus pelo PAGE e a genotipagem pela técnica de RT-PCR também foram consultados. O resultado incluiu, ainda, as fotos dos géis de poliacrilamida e agarose que foram impressos e arquivados junto ao caderno de registro devidamente numerado e identificado.

A seguir, encontram-se descritos os procedimentos para a obtenção das amostras de fezes, preparo da amostra padrão de rotavírus, análise do perfil eletroforético e a genotipagem das amostras.

4.3 Amostras de fezes

As amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal em sacos plásticos, identificados, e mantidas em caixas isotérmicas refrigeradas até serem armazenadas no laboratório a -20°C para posterior análise.

4.4 Pesquisa de rotavírus nas amostras de fezes por meio da técnica de PAGE

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

4.4.1 Suspensão fecal

No laboratório foram realizadas suspensões de fezes a 20% em tampão Tris/cálcio (Tris/HCl 0,1M; CaCl₂ 1,5 mM pH-7,3). As suspensões foram homogeneizadas com agitações periódicas durante 30 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas a 1030 x *g* por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos “eppendorf” e a suspensão foi utilizada para a extração do RNA viral ou estocada a -20°C para posterior análise.

4.4.2 Extração do RNA viral, preparo e coloração do gel de poliacrilamida

Para a extração do ácido nucleico viral foi utilizada a técnica do fenol/clorofórmio. Este procedimento faz parte da rotina do laboratório e está descrito nos Apêndices para consulta. O preparo do gel de poliacrilamida e a técnica de coloração com nitrato de prata também encontram-se dispostos nos Apêndices.

4.5 Amostra padrão de Rotavírus

Foi utilizado como amostra padrão a estirpe de rotavírus bovino NCDV ("Nebraska Calf Diarrhoea Virus"), cedida pelo Prof. Dr. José Antônio Jerez do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal-VPS, da Universidade de São Paulo/SP.

A amostra padrão foi inoculada em cultura de células da linhagem de rim de macaco Rhesus - MA-104, no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV-Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

4.6 Determinação do perfil eletroforético do genoma de rotavírus pela técnica de PAGE

A classificação das amostras quanto aos diferentes perfis eletroforéticos, baseou-se nas diferenças de velocidades de migração dos segmentos genômicos, utilizando-se o método de Lourenço et al. (1981). Esse método consiste na divisão dos 11 segmentos do RNA de rotavírus do grupo A em quatro classes ou arranjos denominados classe I (segmentos 1 a 4), classe II (segmentos 5 e 6), classe III (segmentos 7 a 9) e classe IV (segmentos 10 e 11). Pequenas variações de peso molecular dentro de cada classe interferem no perfil de migração, indicando a presença de perfis eletroforéticos distintos, ou diferentes eletroferótipos. Para tanto, cada segmento genômico da amostra de rotavírus de campo foi comparado com os respectivos segmentos da amostra padrão NCDV. A análise do perfil de migração das amostras de campo tem sido utilizada para caracterizar as amostras de rotavírus, identificando a circulação de diferentes perfis durante os surtos de diarreia. Por meio dessa técnica também é possível fazer a análise presuntiva dos grupos de rotavírus.

4.7 Genotipagem das amostras positivas pela transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida de transcrição-reversa (RT) do RNA viral foi utilizada para a caracterização dos genótipos G e P de rotavírus bovino, baseando-se na metodologia descrita por Gouvea et al. (1990, 1994a, 1994b) e Gentsch et al. (1992).

O comprimento (número de pares de base) do segmento genômico produzido e amplificado na RT-PCR, foi utilizado para a classificação das amostras positivas, comparando com amostras padrão de vírus cultivados em células MA104. As reações em que foram detectadas amplificação de segmentos para dois ou mais genótipos foram refeitas mediante utilização de reação com “primer” separado, com o objetivo de confirmar os achados.

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

O RNA de rotavírus bovino foi extraído a partir de suspensão fecal a 50% preparada em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), e posteriormente clarificadas por centrifugação a 14.000 x *g* por 15 minutos a 4°C, em centrífuga “Eppendorf” refrigerada, modelo 5840R.

Em 250µL da suspensão fecal obtida anteriormente foram adicionados 750µL de TRIZOL Reagent® (Gibco BRL), homogeneizados e após incubação de 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200µL de clorofórmio. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 14.000 x *g* por 15 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante transferido a um novo tubo tipo “eppendorf” e o RNA viral precipitado com 500µL de álcool isopropílico e incubado durante 15 minutos a -20°C. A seguir, a amostra foi centrifugada a 14.000 x *g* por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. Ao material precipitado foram adicionados 950µL de etanol 75% e, novamente centrifugado nas mesmas condições, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e, após secagem em banho-maria seco a 56°C, o sedimento foi

ressuspenso em 17 μ L de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). A amostra foi incubada a 56°C por 10 minutos e conservada a -20°C até o momento do uso.

4.7.2 Síntese do cDNA e reação em cadeia da polimerase

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

Assim, 5 μ L do produto de extração do RNA, previamente desnaturados a 95°C por 5 minutos e mantido em gelo, foi adicionado ao “mix” de reagentes contendo 12,5 μ L do tampão de reação (2x Reaction mix – 0,4mM de dNTPs; 2,4mM MgSO₄), 0,5 μ L da enzima RT/Platinum Taq (Transcriptase Reversa) e 1,25 μ L dos “primers” senso e anti-senso específicos para cada um dos genótipos G ou P, conforme descrito na Tabela 1 (“primers” Beg9, End9, EndCRW8, EndUK e “primers” con3 e con2, respectivamente), na concentração final de 10pmol/ μ L cada. O volume da reação foi completado para 25 μ L com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato).

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

4.7.3 Multiplex “semi-nested” RT-PCR

A segunda amplificação (multiplex “semi-nested” PCR) foi utilizada para a classificação das estirpes de rotavírus e consistiu em adicionar 0,5 μ L de DNA (ácido desoxirribonucléico) amplificado na etapa anterior à solução composta por 2,5 μ L de 10x PCR buffer II; 0,75 μ L de MgCl₂-50mM; 0,5 μ L de DNTPs-10mM; 0,625 μ L na concentração de 20pmol/ μ L de “primer” mix G ou P (SBeg9, DT6, ET10, HT8, FT5,

BT11 ou Con2, pB223, pGoot, pNCDV, pOSU, pUK, respectivamente, conforme dados da Tabela 1) e 0,13µL da enzima Taq polimerase (500U).

O volume da reação foi completado para 25µL com água DPEC. A reação de multiplex “semi - nested” PCR foi submetida a 94°C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 2 minutos a 55°C e 1 minuto a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos. Em seguida, 8 µL dos produtos oriundos da 2ª amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TBE (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,089 M; EDTA 0,002M, pH 8,0), fazendo-se corar o gel em banho de água com 0,5µg/mL de brometo de etídeo por 15 minutos. Utilizou-se como controle positivo a amostra NCDV de rotavírus e água tratada com DPEC como controle negativo.

No Quadro 3, são apresentadas as sequências de cada “primer” (iniciador), a posição no genoma, o comprimento do segmento gênico esperado e as estirpes a partir das quais as sequências foram referenciadas.

Quadro 3. Sequência de bases dos ‘primers’ utilizados para a genotipagem G (VP7) e P (VP4) de rotavírus bovino.

Primer	Sequência de bases	Genótipo	Comprimento do Segmento amplificado	Referência
Beg 9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG		‘Primer’sense	Gouvea et al. (1990)
End 9	GGGGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG		‘Primer’ antisense	Gouvea et al. (1990)
EndUK	GGTCACATCATACAATTCTAATCT			Gouvea et al. (1990)
SBeg	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTTC	G1	-	Gouvea et al. (1990)
EndCRW8	GGTCACATCTTACAGCTTAACCCT			Gouvea et al. (1994)
DT6	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	G6	500 bp	Gentsch et al. (1992)
HT8	CGGTTCCGGATTAGACAC	G8	274 bp	Gentsch et al. (1992)
ET10	TTCAGCCGTTGCGACTTC	G10	715 bp	Gentsch et al. (1992)
FT5	CATGTACTCGTTGTTACGTC	G5	780 bp	Gentsch et al. (1992)
BT11	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	G11	337 bp	Gentsch et al. (1992)
Con 2	ATTTCCGACCATTATAACC		‘Primer’ antisense	Gouvea et al. (1994)
Con 3	TGGCTTCGCTCATTTATAGACA		‘Primer’ sense	Gouvea et al. (1994)
pNCDV	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	P[1]	622 bp	Gouvea et al. (1994)
pUK	GCCAGGTGTGCATCAGAG	P[5]	555 bp	Gouvea et al. (1994)
pB223	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	P[11]	314 bp	Gouvea et al. (1994)
pOSU	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	P[7]	502 bp	Gouvea et al. (1994)
pGott	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	P[6]	423 bp	Gouvea et al. (1994)

4.8 Análise estatística

O trabalho corresponde a análise de variáveis categóricas com pesquisa observacional de um estudo transversal.

Os resultados da pesquisa de rotavírus em bovinos foram separados, tabulados no programa Excel versão 2007, e então e com o auxílio do programa MapInfo Professional versão 7.5 foi realizada análise espacial por meio de ilustrações geográficas.

Os dados obtidos sobre tipo de exploração (leiteiro e corte), amostras com características diarreicas e não diarreicas e idade foram analisados utilizando o programa estatístico Epi Info™ 7.1.4. Foi realizada análise univariada dos dados utilizando o teste qui-quadrado corrigido ($p > 0,05$) de acordo com THRUSFIELD (1995) e, quando necessário, o mesmo foi substituído pelo teste exato de Fisher para determinar se o resultado foi significativo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Detecção de rotavírus nas amostras de fezes por meio técnica de PAGE

Foi realizada a triagem de 803 amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 90 dias, para detecção de rotavírus. As amostras foram obtidas de 48 rebanhos leiteiros e de corte, localizados nos seguintes municípios do Estado de São Paulo: Araçatuba, Cajobi, Descalvado, Guariba, Jaboticabal, Lins, Monte Alto, Monte Aprazível, Ponta Linda, São Carlos, São João da Boa Vista, São José do Rio Preto, Taiaçu, Taiúva e Votuporanga.

Do total de rebanhos avaliados, 72,9% (35/48) eram de gado leiteiro, correspondendo a 85,8% (689/803) das amostras coletadas, e 8,3% (4/48) eram de gado de corte. O teste de PAGE indicou a presença de animais positivos em 33,3% (16/48) dos rebanhos e 6,1% (49/803) das amostras analisadas (Tabela 1).

Tabela 1. Triagem pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção rotavírus em amostras de fezes de bezerros, na faixa etária de 1 a 90 dias de idade, de gado leiteiro e de corte do Estado de São Paulo, no período de 2006 a 2010.

Procedência	Rebanho				Amostras		
	Exploração	Nº	Positivo	%	Nº	Positivo	%
São Paulo	Leiteiro	35	12	34,3	689	23	3,3
	Corte	13	4	30,8	114	26	22,8
	Total	48	16	33,3	803	49	6,1

Nº- Número total testado

%- Porcentagem

Dentre os rebanhos leiteiros 34,3% (12/35) apresentaram animais com resultados positivos para rotavírus pela técnica de PAGE. A ocorrência de rotavírus entre os bezerros leiteiros foi de 3,3% (23/689). No gado de corte, o percentual de positividade entre os rebanhos correspondeu a 30,8% (4/13), enquanto a frequência de casos positivos entre os animais foi de 22,8% (26/114).

Independente da forma de exploração os resultados de triagem de todas as amostras de fezes por meio do PAGE revelaram que 33,3% dos rebanhos leiteiros e

de corte apresentaram resultados positivos para rotavírus, o que demonstra elevada circulação de rotavírus na região estudada (Tabela 1).

Apesar desse achado representativo, quando se compara com dados de prevalência disponíveis na literatura, encontra-se uma grande variação entre os valores. Taxas de prevalência de rotavírus em rebanhos bovinos de até 78%, e mesmo valores mais baixos, ao redor de 50% e 40% são relatados (SNODGRASS et al., 1986; REYNOLDS et al., 1986; LUCCHELLI et al., 1992). Entretanto, deve ser destacado que a maioria dos estudos sobre a infecção por rotavírus em bovinos foi realizado em rebanhos durante surtos de diarreia, com a maior parte das amostras coletadas de bezerros que manifestavam quadros clínicos. No presente trabalho foram amostrados todos os bezerros da propriedade, na faixa etária de 1 a 90 dias, independente dos animais estarem manifestando sinais clínicos de enterite, havendo dessa forma uma diferença na determinação da amostragem dos animais, o que pode explicar a variação de resultados nos diferentes estudos (LUCCHELLI et al., 1992).

Quando se compara o resultado do presente estudo com trabalhos realizados no Brasil, verifica-se também que entre os animais é inferior ao obtido por Jerez et al. (2002), que detectaram 14% de positividade, porém próximo ao obtido por Buzinaro; Freitas (2002) e Freitas et al. (2011), que constataram que os rotavírus estavam associados a 9,9% e 6,7% dos casos estudados, respectivamente, em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo.

5.1.1 Caracterização de positividade e local de origem dos rebanhos bovinos

Os resultados do teste de PAGE para detecção de rotavírus nas amostras de gado leiteiro e de corte do Estado de São Paulo encontram-se nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

Dentre as 269 amostras de gado leiteiro com diarreia, 5,6% foram positivos para rotavírus, enquanto 1,9% (8/420) foram detectados em bezerros clinicamente saudáveis. Os municípios onde localizavam-se os rebanhos com casos positivos foram Araçatuba, Cajobi, Descalvado, Guariba, Pontalinda, Taiaçu e Votuporanga (Figura 3).

A análise estatística pelo teste do qui-quadrado revelou uma relação significativa entre a detecção de rotavírus e o quadro clínico de diarreia em rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo ($p=0,0164000$; $RR = 2,93$; $IC\ 95\%: 1,26 - 6,81$).

Nas propriedades de gado de corte 45,6% (26/57) das amostras de bezerros com sinais clínicos de diarreia foram positivas para rotavírus, enquanto nenhuma amostra positiva foi detectada em bezerros não diarreicos. As amostras positivas foram detectadas nos municípios de Araçatuba, Catiguá e Fernandópolis com frequências de 67%, 33,3 e 54,5%, respectivamente (Tabela 3).

A análise estatística pelo teste do qui-quadrado revelou uma relação significativa indefinida ($p = 0,7 \times 10^{-10}$; $RR = \text{indefinido}$), pois não houve casos positivos em animais sem diarreia.

A ocorrência do rotavírus nos bezerros de gado leiteiro e de corte (Figura 3) sugere a disseminação do agente entre os animais e a circulação do vírus no ambiente deste estudo. No gado leiteiro a frequência de infecção em animais com e sem diarreia foi de 5,6% e 1,9%, respectivamente (Tabela 2), resultados muito próximos à frequência de 6,7% detectado por Freitas et al. (2011) no Estado de São Paulo e 7,17% verificado por Brito (1994), no Estado de Goiás.

Para confirmar a associação entre a infecção por rotavírus no gado leiteiro e a manifestação de diarreia os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste qui-quadrado. O resultado foi significativo a 5% no teste ($p < 0,05$), o que sugere que quando da detecção de amostra positiva, as fezes tendem a ser diarreicas, e quando a amostra é negativa as fezes tendem a serem normais fato já relatado anteriormente por Freitas et al.(2011).

A presença de animais sem sinais clínicos eliminando rotavírus nas fezes é de grande importância epidemiológica, uma vez que sugere a presença de animais infectados subcl clinicamente e que podem atuar como fontes de infecção para os outros bezerros (FIJTMAN et al., 1987). Outro fato a ser questionado é que a técnica de PAGE utilizada no presente estudo é muito sensível e pode detectar partículas de rotavírus nas fezes mesmo quando os bezerros já passaram pela fase aguda da doença. Na rotavirose, a grande quantidade de partículas virais eliminadas nas fezes e o longo período de eliminação são fatores que contribuem para elevar a

contaminação ambiental e dificulta o controle da infecção nos rebanhos (BRIDGER, 1994).

A frequência de infecção por rotavírus no gado de corte foi de 22,8%, totalmente associados a animais com sinais clínicos de diarreia, confirmando a importância desse vírus como agente etiológico de diarreias neonatais em bezerros de corte (ALFIERI et al., 2006; OLIVEIRA FILHO et al., 2007; BUZINARO et al., 2009).

Apesar das propriedades de gado 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 fosse inferior àquela detectada e, portanto, comparável aos encontrados em estudos no Brasil (BRITO et al., 1994; BUZINARO; FREITAS, 2002; FREITAS et al., 2011). 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 a incidência de diarreia nos rebanhos de corte, conforme já verificado anteriormente por Buzinaro et al.(2003).

Também Medeiros et al. (2014), estudando surto de diarreia neonatal em bezerros da raça Nelore no Estado do Mato Grosso do Sul, identificaram o rotavírus bovino em 80% das amostras analisadas pelo PAGE, comprovando a importância do agente nas diarreias de gado de corte. Outro fato que deve ser considerado é que a maioria das amostras recebidas para diagnóstico no Laboratório de Rotavirose era provenientes de rebanhos de gado de corte com surtos de diarreia o que contribuiu para aumentar a probabilidade de determinação de maior taxa de infecção.

Esses resultados indicam que o rotavírus participa da etiologia das diarreias no gado de corte, merecendo um maior cuidado no manejo sanitário de bezerros e na tomada de medidas para reduzir a taxa de infecção e a permanência do agente nos rebanhos (BARREIROS et. al., 2004; FREITAS et al., 2009).

Tabela 2. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros pelo teste de eletroforese em gel de poliacrilamida, na faixa etária de 1 a 90 dias, de gado leiteiro com e sem diarreia no Estado de São Paulo, colhidas entre 2006 e 2010.

Municípios	Rebanho			Animais c/ diarreia			Animais s/ diarreia			Total de Amostras		
	Nº	Positivo	%	Nº	Positivos	%	Nº	Positivos	%	Nº	Positivas	%
Araçatuba	1	1	100	8	0	0	37	1	2,7	45	1	2,2
Cajobi	1	1	100	5	1	20	0	0	0	5	1	20
Descalvado	10	5	50	161	10	6,2	192	6	3,1	353	16	4,5
Guariba	1	1	100	1	0	0	4	1	25	5	1	20
Jaboticabal	4	0	0	6	0	0	21	0	0	27	0	0
Lins	1	0	0	10	0	0	0	0	0	10	0	0
Monte Alto	1	0	0	2	0	0	11	0	0	13	0	0
Monte Aprazível	1	0	0	0	0	0	5	0	0	5	0	0
Ponta Linda	1	1	100	1	1	100	0	0	0	1	1	100
São Carlos	1	0	0	0	0	0	40	0	0	40	0	0
São João da Boa Vista	1	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0
São José do Rio Preto	1	0	0	2	0	0	5	0	0	7	0	0
Taiacu	7	2	29	44	2	4,5	82	0	0	126	2	1,6
Taiuva	1	0	0	10	0	0	0	0	0	10	0	0
Votuporanga	3	1	33	13	1	7,7	23	0	0	36	1	2,8
Total	35	12	34	269	15	5,6	420	8	1,9	689	23	3,3

Nº- Número total testado

%- Porcentagem

Tabela 3. Detecção de rotavírus em amostras de fezes de bezerros pelo teste de eletroforese em gel de poliacrilamida, na faixa etária de 1 a 90 dias, de gado de corte, com e sem diarreia no Estado de São Paulo, colhidas entre 2006 e 2010.

Municípios	Rebanho			Animais c/ diarréia			Animais s/ diarreia			Total de Amostras		
	Nº	Positivo	%	Nº	Positivos	%	Nº	Positivos	%	Nº	Positivas	%
Araçatuba	3	2	66,7	21	15	71,4	2	0	0	23	15	65,2
Catiguá	2	1	50	12	5	41,7	3	0	0	15	5	33,3
Colina	2	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0
Fernandópolis	1	1	100	11	6	54,5	0	0	0	11	6	54,5
Franca	2	0	0	0	0	0	40	0	0	40	0	0
Orlândia	1	0	0	5	0	0	0	0	0	5	0	0
São José do Rio Preto	1	0	0	0	0	0	9	0	0	9	0	0
Tabapuã	1	0	0	3	0	0	3	0	0	6	0	0
Total	13	4	30,8	57	26	45,6	57	0	0	114	26	22,8

Nº- Número total testado

%- Porcentagem

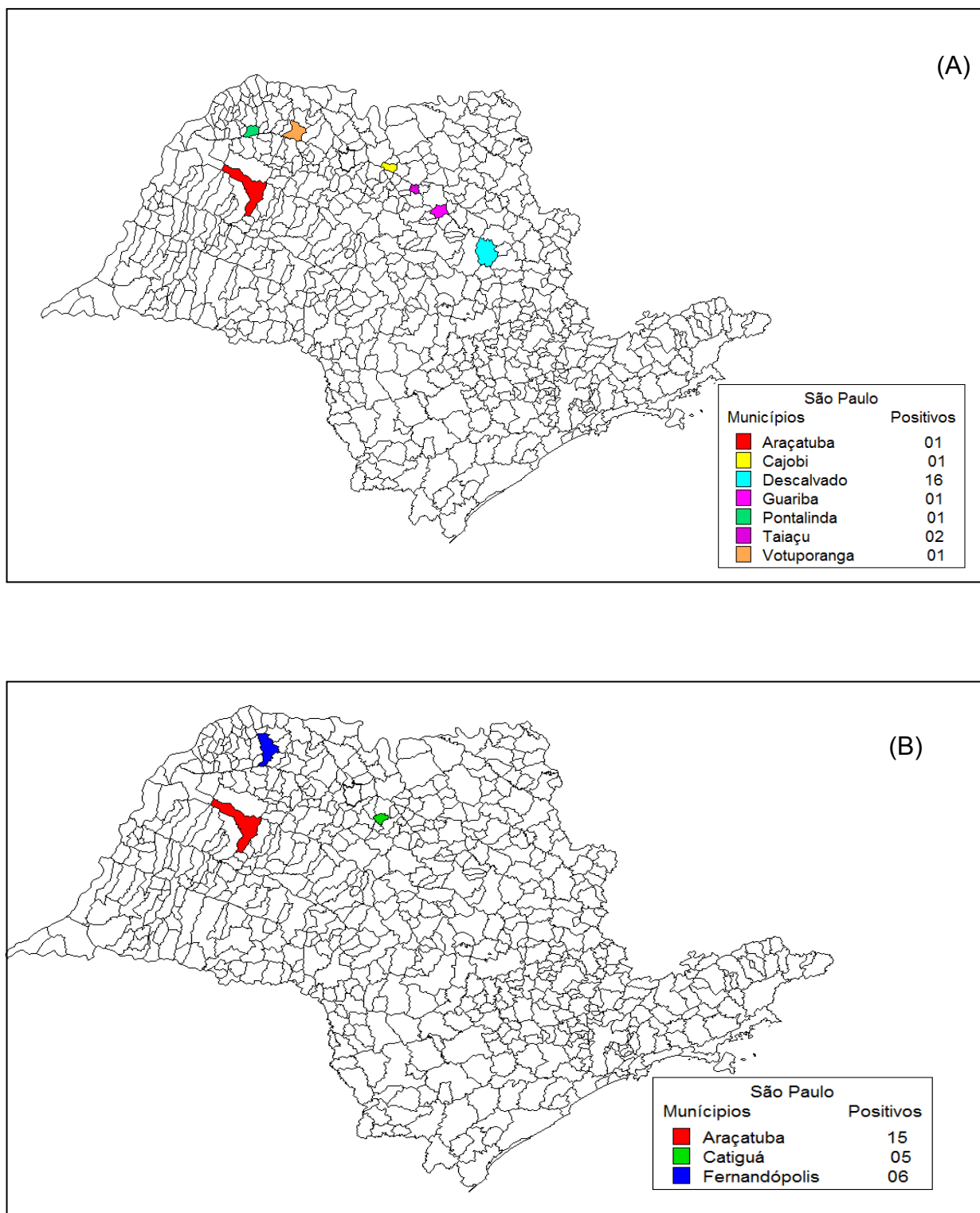


Figura 3. Divisões geográficas do Estado de São Paulo destacando os municípios onde estão localizados os rebanhos de gado leiteiro (A) e de corte (B) com amostras positivas para rotavírus, colhidas entre 2006 e 2010.

5.1.2 Caracterização da positividade conforme a idade

Informações referentes à faixa etária dos bezerros foram obtidas de 742 (92,4%) do total de 803 animais estudados, sendo 628 de bezerros leiteiros e 114 de gado de corte.

Os resultados das amostras positivas para rotavírus, no PAGE, segundo a idade dos bezerros de rebanhos leiteiros e de corte, encontram-se nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Conforme verificado na Tabela 4, a ocorrência de rotavírus nos bezerros leiteiros com idade entre 1 e 15 dias e 16 e 30 foi de 3,8% (8/208) e 4,3% (10/230), respectivamente. Na faixa etária entre 31 e 45 dias, 0,9% (1/111) dos animais estavam eliminando rotavírus nas fezes, enquanto a frequência de casos positivos entre animais com idades de 46 a 60 dias foi de 3% (2/67). Nos bezerros com 60 a 90 dias de idade, 8,3% (1/12) foram positivos para rotavírus. Também foram descritos 61 animais de idade não definida dos quais um (1) deles (1,6%) foi positivo para rotavírus.

Os dados da Tabela 4 foram submetidos à análise estatística pelo teste de qui-quadrado e os valores obtidos não apresentaram resultados significativos ($p > 0,05$).

Tabela 4. Amostras positivas para rotavírus na eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo a faixa etária dos animais e a consistência das fezes, em rebanhos bovinos leiteiros no Estado de São Paulo, colhidas entre 2006 e 2010.

Faixa etária (Dias)	Animais c/ diarreia			Animais s/ diarreia			Total de Amostra		
	Nº	Positivo	%	Nº	Positivo	%	Nº	Positivo	%*
1 a 15	109	5	4,6	99	3	3,0	208	8	3,8 ^a
16 a 30	88	6	6,8	142	4	2,8	230	10	4,3 ^a
31 a 45	40	1	2,5	71	0	0,0	111	1	0,9 ^a
46 a 60	12	1	8,3	55	1	1,8	67	2	3,0 ^a
60 a 90	4	1	25,0	8	0	0,0	12	1	8,3 ^a
Não definida	16	1	6,3	45	0	0	61	1	1,6 ^a
Total	269	15	5,6	420	8	1,9	689	23	3,3

Nº- Número total testado

%- Porcentagem

* Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste do qui-quadrado ($p > 0,05$).

No gado de corte os resultados indicaram 46,2% (12/26) e 60,9% (14/23) de animais positivos na faixa etária entre 1 a 15 e 16 a 30 dias, respectivamente. Nos bezerros com 31 a 90 dias de idade não foram detectados animais positivos (Tabela 5).

Os dados da Tabela 5 foram submetidos à análise estatística pelo teste de qui-quadrado e revelou uma relação significativa entre a idade e a positividade para rotavírus ($p > 0,05$). A maior frequência de infecção foi diagnosticada em animais na faixa de 16 a 30 dias de idade, resultados semelhantes aos obtidos por McNulty e Logan (1983) e Lucchelli et al. (1992) que encontraram uma maior frequência de rotavírus principalmente nas duas primeiras semanas de vida. Entretanto, em estudo conduzido no Estado de São Paulo por Buzinaro et al. (2003), durante surto de diarreia, em bezerros de gado de corte todos os animais positivos para rotavírus apresentaram diarreia após 30 dias.

A literatura tem mostrado que em rebanhos leiteiros a taxa de infecção é maior durante as primeiras semanas de vida, e a eliminação de partículas virais através das fezes coincide com a queda de anticorpos do colostro, tornando o bezerro susceptível à infecção logo após o nascimento (MCNULTY; LOGAN, 1983). Essa observação está relacionada à deficiência de imunidade dos animais recém-nascidos, que dependem da transferência passiva de anticorpos maternos, principalmente das classes, IgG1 e IgA. Para uma imunização artificial eficiente, as fêmeas devem ser vacinadas no final da gestação para que no momento do parto o título de anticorpos alcance níveis protetores (FERNANDEZ et al., 1998).

Outro fator importante que deve ser considerado na proteção de bezerros recém-nascidos é que embora muitas vacas são soro-positivas para rotavírus devido contato ambiental, o título de anticorpos maternos cai a níveis não protetores no momento do parto em fêmeas não vacinadas, comprometendo a transferência da imunidade passiva e tornando o bezerro susceptível à infecção (FERNANDES et al., 1998). Assim, a vacinação das fêmeas antes do parto, prolonga de forma significativa a excreção de anticorpos no colostro e no leite (Le ROUSIC et al. 2000), aumentando a resistência à infecção durante o período de maior susceptibilidade dos animais (MCNULTY; LOGAN, 1983; Le ROUSIC et al. 2000).

Nos rebanhos amostrados, a vacinação de fêmeas gestantes como medida para prevenção da diarreia neonatal não é prática rotineiramente adotada no manejo sanitário de bovinos. Dessa forma, a exposição dos animais logo após o nascimento em um ambiente de alta circulação viral predispõe os animais à infecção e justifica a frequência observada.

Além da imunidade passiva também deve ser considerado o aumento da resistência natural à infecção como justificativa da menor proporção de casos positivos em bezerros acima de 60 dias. Esta baixa taxa de resultados positivos é devido aos animais mais velhos serem resistente à doença, porque a reposição dos enterócitos é mais intensa e compete com a replicação viral, de forma que somente as estirpes virais muito virulentas podem causar diarreia nesses bezerros (CRAWFORD et al., 2006).

Tabela 5. Amostras positivas para rotavírus na eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo a faixa etária dos animais e a consistência das fezes, em rebanhos bovinos de corte no Estado de São Paulo, colhidas entre 2006 e 2010.

Faixa etária (Dias)	Animais c/ diarreia			Animais s/ diarréia			Total de Amostra		
	Nº	Positivo	%	Nº	Positivo	%	Nº	Positivo	%*
1 a 15	23	12	52,2	3	0	0	26	12	46,2 ^{a,c}
16 a 30	23	14	60,9	0	0	0	23	14	60,9 ^a
31 a 45	3	0	0,0	0	0	0	3	0	0,0 ^a
46 a 60	5	0	0,0	51	0	0	56	0	0,0 ^b
60 a 90	3	0	0,0	3	0	0	6	0	0,0 ^c
Total	57	26	45,6	57	0	0	114	26	22,8

Nº - Número total testado

% - Porcentagem

*Letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste do qui-quadrado ($p < 0.05$).

5.2 Análise do perfil eletroforético do genoma de rotavírus pela técnica de PAGE

As amostras de rotavírus quando analisadas no gel de poliacrilamida apresentaram um padrão de migração típico de rotavírus do grupo A; quatro segmentos de alto peso molecular (1 a 4 – grupo I), dois segmentos de peso médio (5, 6 – grupo II), três segmentos intermediários (7, 8 e 9 – grupo III), e por fim o grupo IV com dois segmentos mais leves (10 e 11) (ESTES, 2001).

As amostras positivas foram comparadas ao padrão NCDV de rotavírus bovino para a determinação do perfil genômico. De acordo com a migração eletroforética do genoma do rotavírus no gel de poliacrilamida foram identificados sete perfis genômicos, característicos do grupo antigênico A, denominados ao acaso A, B, C, D, E, F, G e H. Os resultados obtidos da análise dos eletroferótipos das 49 amostras positivas para rotavírus encontram-se nas Tabelas 6 e 7 e Figuras 8 e 9.

Do total de amostras positivas, 12 pertenciam ao eletroferótipo A, 2 ao B, 6 ao C, 1 ao D, 1 ao E, 5 ao F, 6 ao G e 1 ao H e 15 amostras não foram classificadas. Nos rebanhos leiteiros do Estado de São Paulo foram identificados três perfis distintos (A, C e G), enquanto nos rebanhos de corte foram detectados oito diferentes perfis (A, B, C, D, E, F, G e H).

As principais diferenças encontradas na velocidade de migração dos segmentos genômicos de rotavírus bovino foram verificadas comparando-se os perfis quando distribuídos separadamente no gel. Assim, de acordo com a velocidade de migração do genoma do rotavírus as diferenças encontradas foram relativas à posição dos segmentos dos arranjos I e III. Nas Figuras 8 e 9 encontram-se amostras representativas dos perfis A, C, F, G e H.

Comparando-se os perfis C e F (Figura 4) verificam-se alterações na posição de migração dos segmentos 2 e 3 do arranjo I, e segmentos 7, 8 e 9 do arranjo III, o mesmo ocorrendo quando foram comparados os perfis A e G (Figura 5).

Nos rebanhos leiteiros do município de Descalvado três perfis foram identificados (A, C e G), porém com predominância do perfil A. Houve predominância também nos rebanhos de corte do município de Araçatuba de cinco perfis (B, C, D, E e F) com destaque para os tipos C e F (Tabela 7). Apesar da grande diversidade genômica entre as estirpes de rotavírus, com sete perfis

distintos, um único eletroferótipo (tipo G) foi identificado nos bezerros de gado de corte do município de Catiguá. Em relação a esses resultados, dados semelhantes foram obtidos em trabalhos realizados na Argentina (FIJTIMAN et al., 1987) e no Japão (ISHIZAKI et al., 1995), nos quais não foi encontrada diversidade genômica entre estirpes de rotavírus, quando estudadas por períodos de seis meses a um ano.

Trabalhos realizados por outros autores em rebanhos bovinos leiteiros também detectaram grande variação de perfil eletroforético entre as amostras (THEIL; McCLOSKEY, 1989; MENDES et al. 1993). Resultados semelhantes foram obtidos no Brasil por Jerez et al. (1989); Buzinaro et al. (2000) e Freitas et al. (2011) que identificaram diferentes perfis circulando em rebanhos bovinos do Estado de São Paulo.

As razões para a ocorrência de eletroferótipos distintos estarem circulando entre os bezerros não foram determinadas. Este fato poderia indicar a introdução de novas estirpes no rebanho, ou surgimento de uma variante com vantagens seletivas ou, ainda, quando uma amostra previamente associada com infecções assintomáticas que se torna virulenta. A análise do perfil do genoma por eletroforese em gel de poliacrilamida é uma técnica útil para se distinguir diferenças entre amostras de campo e fornecer informações sobre o significado epidemiológico da variação genômica dos rotavírus. Contudo, não fornece dados sobre a diversidade antigênica dos genótipos envolvidos. A determinação dos genótipos é imprescindível para avaliar as estratégias de vacinação.

Tabela 6. Tipos eletroforéticos de rotavírus bovino distribuídos segundo os municípios e os rebanhos de origem, em bezerros de gado leiteiro do Estado de São Paulo, no período de 2006 a 2010.

Municípios	Rebanho *	Amostra*	Perfis eletroforéticos							Amostras não classificadas
			A	B	C	D	E	F	G	
Araçatuba	1	1								1
Cajobi	1	1								1
Guariba	1	1								1
Taiacu	2	2	1							1
Pontalinda	1	1								1
Descalvado	5	16	9		1				1	5
Votuporanga	1	1								1
Total	12	23	10	0	1	0	0	0	1	11

* Positivo

Tabela 7. Tipos eletroforéticos de rotavírus bovino distribuídos segundo os municípios e os rebanhos de origem, em bezerros de rebanhos de gado de corte do Estado de São Paulo, no período de 2006 a 2010

Municípios	Rebanho *	Amostra*	Perfis eletroforéticos								Amostras não classificadas
			A	B	C	D	E	F	G	H	
Araçatuba	2	15		1	5	1	1	5		1	1
Catiguá	1	5							5		
Fernandópolis	1	6	2	1							3
Total	4	26	2	2	5	1	1	5	5	1	4

* Positivo

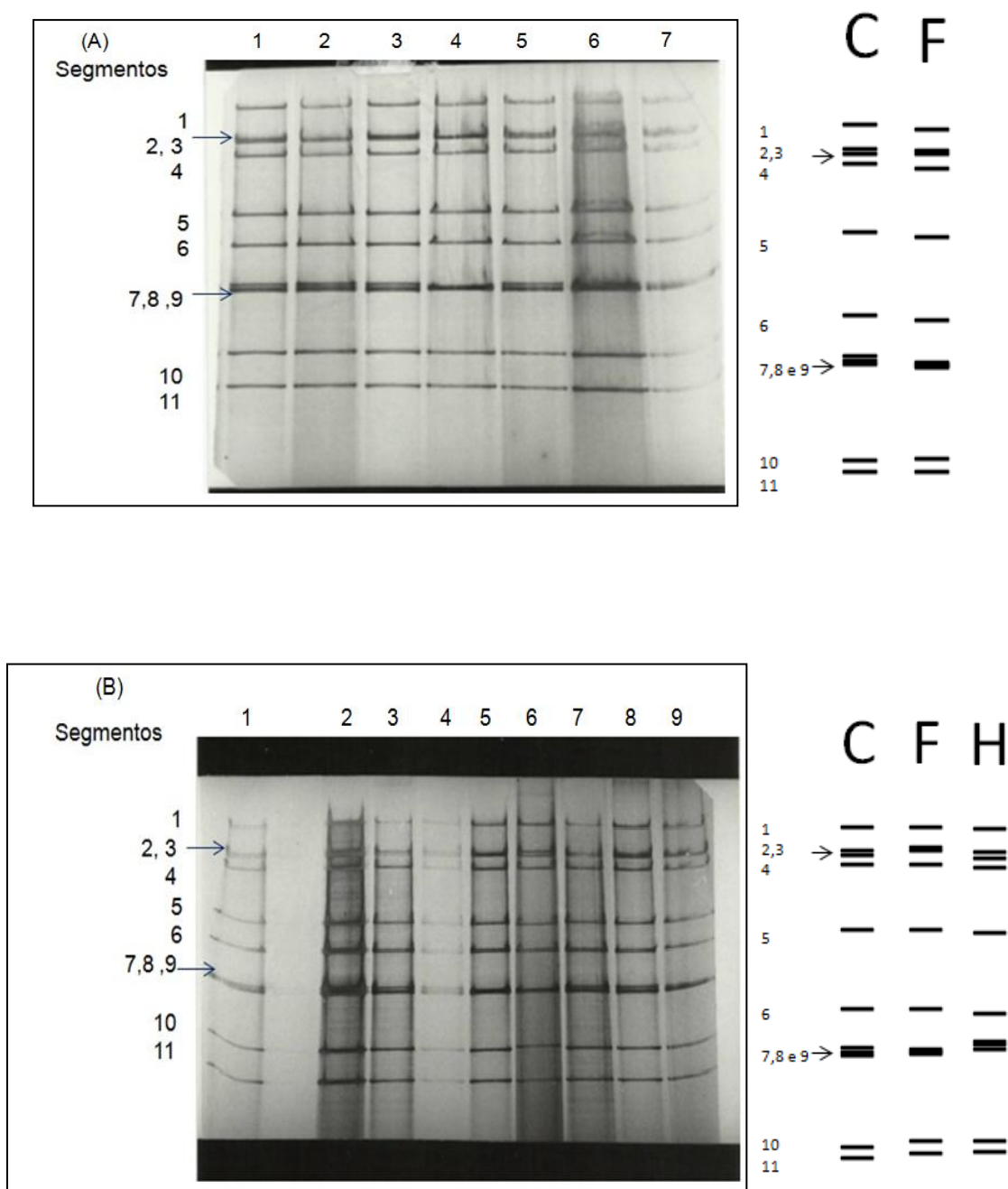


Figura 4. Perfil eletroforético do genoma de rotavírus detectado em bezerros de rebanhos de corte no Estado de São Paulo, em comparação com a amostra padrão NCDV.

(A) Canaleta 1, 2, 3, 5, 6 (perfil C); 4 (perfil F); 7 (Padrão NCDV).

(B) Canaleta 1 e 9 (Padrão NCDV); 2, 3, 4, 7, 8 (perfil C); 5 (perfil F); 6 (perfil H)

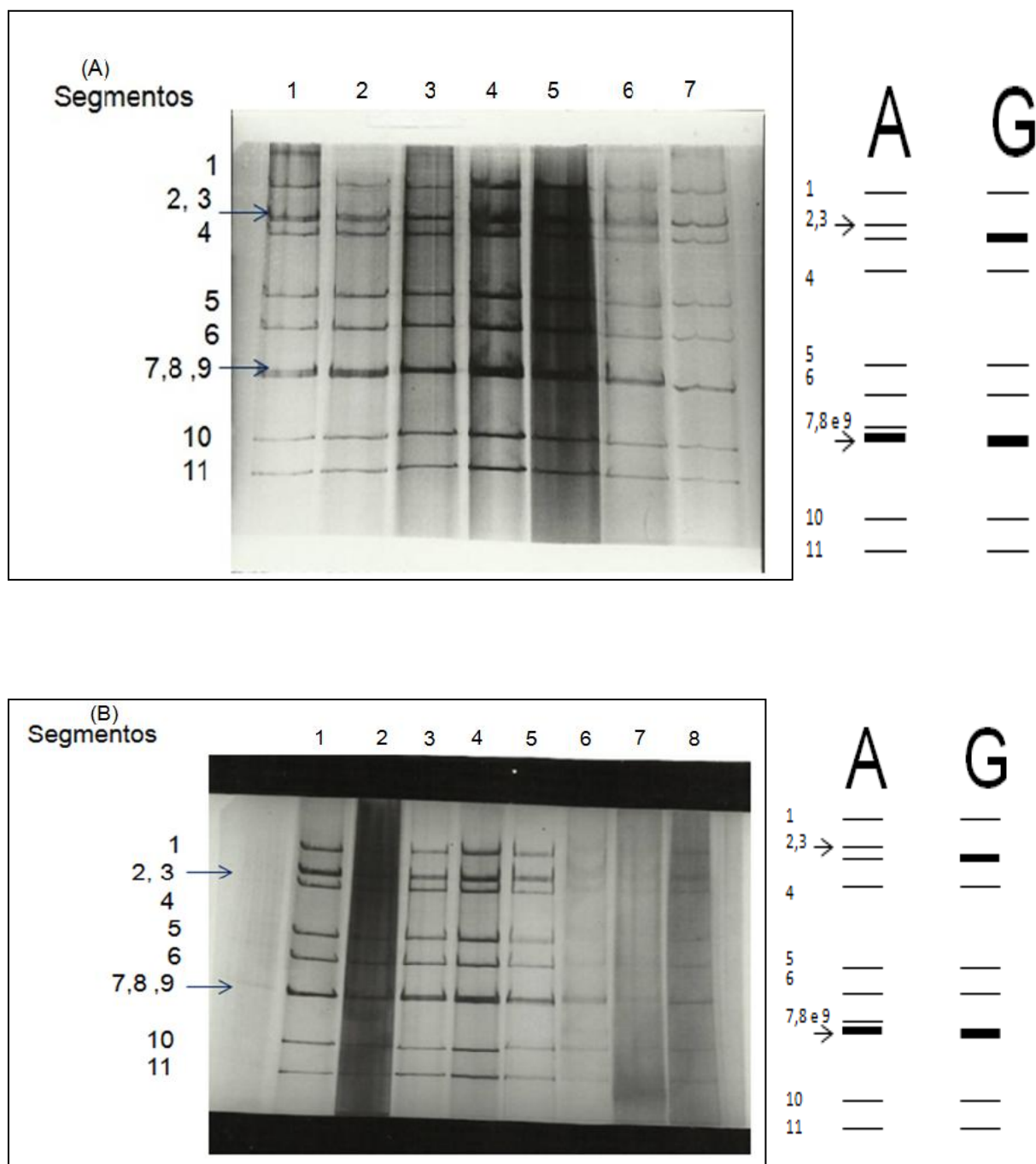


Figura 5. Perfil eletroforético do genoma de rotavírus detectado em bezerros de rebanhos de corte no Estado de São Paulo, em comparação com a amostra padrão NCDV.

(A) canaleta 1, 2, 4 e 5 (perfil A); 3, 6 e 7 (perfil G) 7(Padrão NCDV).

(B) canaleta 1 (Padrão NCDV); 2, 3 e 8 (perfil G); 4, 5, 6 e 7 (perfil A).

5.3 Distribuição temporal de rotavírus no período de 2006 a 2010

Durante o período de 2006 a 2010, foram analisadas pela técnica de PAGE 803 amostras de fezes de bezerros para detecção de rotavírus, colhidas entre janeiro e dezembro, no Estado de São Paulo. As 49 amostras positivas estão distribuídas entre os anos de 2006, 2007, 2008 e 2010, com 5,7%, 6,1%, 14% e 3,7% de positividade, respectivamente (Tabela 8). No ano de 2009 não foram detectadas casos positivos.

Nas Figuras 6 e 7 encontram-se os resultados da distribuição temporal de rotavírus em bezerros ao longo do período estudado. De acordo com essas figuras, verifica-se que o maior número de casos positivos ocorreu nos meses de setembro (15 casos) e maio a junho (13 casos), correspondendo ao período de seca. No período chuvoso, outubro a março foram detectados 20 casos positivos. A frequência de casos de positivos de rotavírus bovino na estação chuvosa (n=20) e na seca (n=29) foram analisados pelo qui-quadrado e os resultados indicaram que não houve diferença significativa ($p>0,05$).

Tabela 8. Distribuição temporal de rotavírus em bezerros, com e sem diarreia, de rebanhos bovinos leiteiros e de corte, do Estado de São Paulo, coletadas entre 2006 e 2010

Ano	*Nº	Positivas	%
2006	175	10	5,7
2007	163	10	6,1
2008	164	23	14,0
2009	139	0	0
2010	162	6	3,7
Total	803	49	6,1

*Número total de amostras

Nos países de clima temperado, onde predominam os meses mais frios, a infecção por rotavírus no ser humano apresenta uma distribuição tipicamente sazonal, com epidemias nos meses de inverno (McNULTY; LOGAN, 1983;

KAPIKIAN e CHANOCK, 1996). Nessas regiões as estações do ano são bem definidas onde as variações de temperaturas e umidade do ar são bastantes pronunciadas, podendo influenciar na ocorrência. Contudo, nas áreas de clima tropical, a sazonalidade não é tão marcante, manifestando-se como doença de caráter endêmico, com casos esporádicos ou surtos, em qualquer estação do ano (WYATT et al., 1979; BLACKLOW et al., 1991, BRESEE et.al., 1999).

No Brasil, estudos envolvendo infecções por rotavírus em crianças nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste apresentam pico predominante nos meses mais frios ou no período seco entre abril a setembro; já para as regiões Norte e Nordeste, a sazonalidade não é tão marcante ocorrendo durante todo o ano (PEREIRA et al., 1993; LINHARES et al., 1992; CAMPOS et al., 2003; COSTA et al., 2004). No Estado de São Paulo, Costa (1992) verificou maior número de casos positivos para rotavírus em frangos de corte na estação do outono.

Em nosso meio, não há dados sobre a distribuição sazonal de rotavírus em bovinos. Considerando a extensa área geográfica do país e a diversidade de climas no Brasil, trabalhos envolvendo as diferentes regiões serão necessários para avaliar a distribuição temporal dos rotavírus.

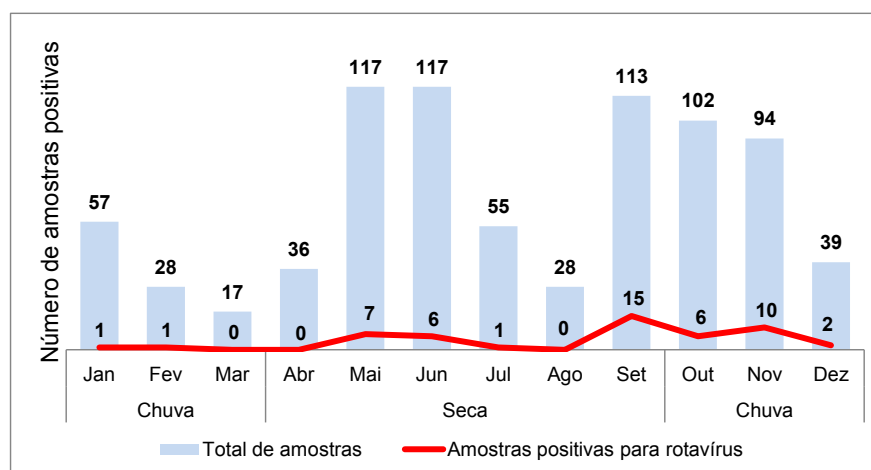


Figura 6. Distribuição temporal de rotavírus conforme o total de amostras analisadas em bezerros do Estado de São Paulo, entre 2006 e 2010.

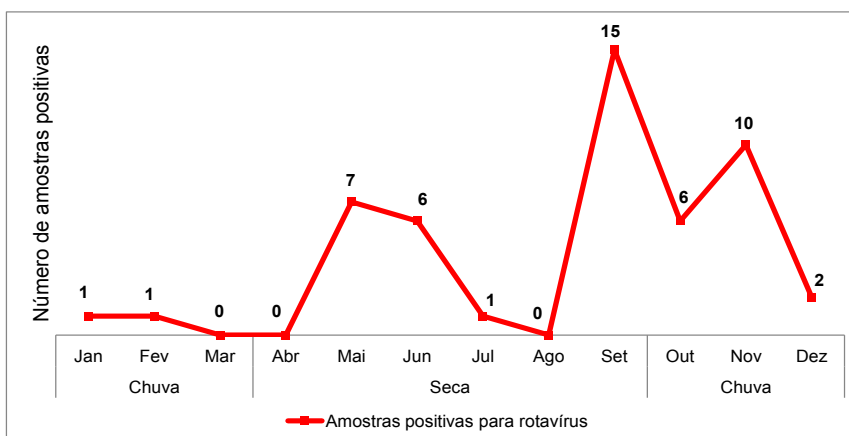


Figura 7. Distribuição temporal das amostras positivas para rotavírus em bezerros de rebanhos leiteiros e de corte no Estado de São Paulo, entre 2006 e 2010.

5.4 Caracterização dos genótipos G (VP7) e P (VP4) pela RT-PCR

A caracterização dos genótipos G (VP7) e P (VP4) pela RT-PCR foi realizada em 41 amostras positivas para rotavírus do grupo A. Foram detectadas quatro diferentes associações de genótipos G e P: G6P[5]; G10P[5]; G10P[11] e G6P[5+11]. Nos rebanhos leiteiros foi observado a ocorrência dos genótipos G10P[5] e G6P[5]. Nos rebanhos de corte foram identificados os genótipos G6P[5], G10P[5], e infecção mista pelo genótipo G6P[5+11]. Em dez amostras (12,7%) os genótipos G ou P foram parcialmente identificados (Tabela 9; Figura 8).

O genótipo G6 foi o mais frequente entre as amostras genotipadas com 73,2% (30/41), seguido do tipo G10 9,7% (4/41). Já na distribuição do genótipo P observa-se que o tipo P[5] foi o predominante entre as amostras genotipadas com 73,2% (30/41), seguido do tipo P[11] 15,7% (11/70). Em duas amostras (2,9%; 2/70) foi detectado mistura dos tipos P[5+11] (Tabela 9; Figura 8).

De acordo com a Tabela 9 as associações mais comuns dos tipos G e P detectadas nas amostras de rotavírus foram G6P[5] com 70% (49/70), seguido de G6P[11] com 7,1% (5/70) e G10P[11] com 2,8% (2/70).

Na Figura 9 estão representados os segmentos amplificados da genotipagem G. A partir da amostra BO/R 886 foi amplificado um segmento de 715 pares de base, característico do genótipo G10, enquanto as demais amostras produziram segmentos amplificados de 500 pares de base, característicos do tipo G6.

Na Figura 10 encontram-se os segmentos amplificados da genotipagem P, mostrando o perfil de migração dos genótipos P[5] e P[11] das estirpes de campo BO/R 514 (555 pb) e BO/R 886 (314 pb), respectivamente.

A caracterização molecular de 41 amostras de rotavírus bovino foi realizada pela reação de RT-PCR, utilizando-se diferentes pares de primers específicos para os genótipos G e P de rotavírus suínos e de bovinos.

Os resultados encontrados no presente trabalho confirmam os estudos disponíveis na literatura. Os genótipos G6 e G10 são considerados epidemiologicamente os mais relevantes para a espécie bovina (SNODGRASS et al., 1990; ESTES, KAPIKIAN, 2007; MARTELLA et al., 2010), enquanto estirpes pertencentes a G1a G3, G5 e G11 são detectados esporadicamente. Além disso, não foi observada a presença de genótipos característicos de rotavírus suíno, apesar da transmissão de rotavírus do grupo A entre as espécies bovina e suína já ter sido descrita (GOUVEA et al., 1994).

No Brasil, os genótipos G6 e G10 já foram relatados em estudos anteriores (BRITO et al., 2000, ALFIERI et al., 2004, BARREIROS et al., 2004, BUZINARO et al., 2009; CARUZO et al., 2010), apenas confirmando a comprovação de Snodgrass et al. (1990) com relação à importância desses genótipos para a rotavirose bovina.

Para o genótipo P, as estirpes virais classificadas foram P[5] e P[11], os genótipos que já foram associadas à infecção por rotavírus tanto em rebanhos bovinos nacionais (BRITO et al., 2000, BUZINARO et al., 2009; MEDEIROS et al., 2014), quanto em rebanhos de outros países, como Japão, Austrália e Argentina, comprovando a predominância desses genótipos nas infecções por rotavírus em bovinos (FUKAY et al., 2002; HUANG et al., 1992; BADARACCO et al., 2013).

Vale ressaltar que outros os genótipo como G8 e P[1] não foram identificados nas amostras analisadas, apesar de estudos conduzidos por Alfieri (1999), em rebanhos bovinos de diferentes Estados da federação, terem constatado a presença dos referidos genótipos em rebanhos brasileiros. Independentemente desse resultado, deve-se destacar a importância do genótipo G8 que foi associado à graves surtos de diarreia em rebanhos japoneses e a presença do genótipo P[1] em diversos estudos epidemiológicos, mesmo que em baixa frequência (FUKAY et al., 2002).

E, finalmente, ressalta-se que os dados obtidos no estudo sobre a epidemiologia molecular dos rotavírus em bovinos no Estado de São Paulo trazem informações importantes sobre a caracterização genotípica das estirpes de campo para a implementação de medidas de prevenção e controle da diarreia neonatal bovina.

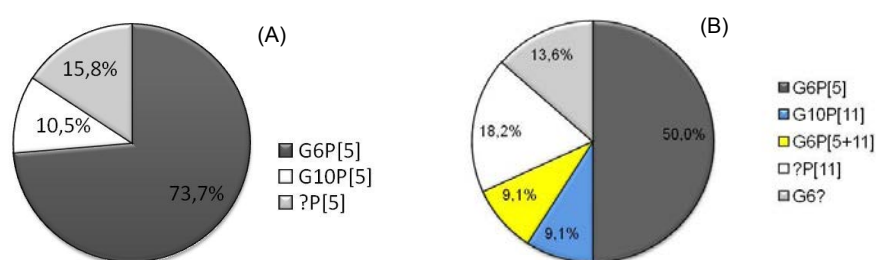


Figura 8. Frequência dos genótipos G e P de rotavírus caracterizada pela reação em cadeia da polimerase em rebanhos bovinos do Estado de São Paulo, no período de 2006 e 2009. (A) gado leiteiro. (B) gado de corte.

Tabela 9. Resultados da genotipagem G (VP7) e P (VP4) em amostras de fezes de bovinos leiteiros e de corte no Estado de São Paulo pela reação em cadeia da polimerase, entre 2006 e 2010.

Genótipo	Rebanho leiteiro		Rebanho de corte		Total
	NºAmostra	%	NºAmostra	%	NºAmostra
G6P[5]	14	73,68	11	50	25
G10P[5]	2	10,53			2
G10P[11]			2	9,1	2
G6P[5+11]			2	9,1	2
?P[5]	3	15,79			3
?P[11]			4	18,2	4
G6?		0	3	13,6	3
Total	19	46,3	22	53,7	41

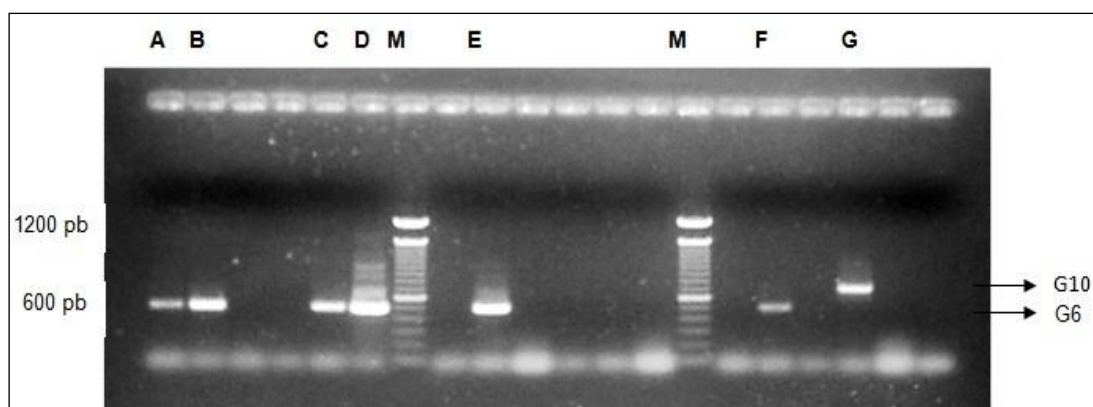


Figura 9. Produtos da genotipagem G de rotavírus pela RT-PCR de amostras de campo e referência. Linha M, marcador de peso molecular (100 pb); linha A, estirpe de referência de rotavírus grupo A (NCDV); linhas B, C, D, E, F (G6) e (G10).

6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho em gado bovino leiteiro e de corte nas regiões Nordeste e Centro-Oeste do Estado de São Paulo permitiram as seguintes conclusões:

- a frequência de rotavírus do grupo A em bezerros de gado leiteiro foi menor do que a observada em gado de corte, e em ambos os rebanhos a infecção foi restrita a animais com até 90 dias, no Estado de São Paulo
- a detecção de rotavírus em bezerros leiteiros e de corte, indicou a participação do agente nos casos de diarreia ao longo do período estudado,
- a detecção de rotavírus em animais sem sinais clínicos de diarreia sugere a presença de animais portadores da infecção no rebanho;
- análise do perfil do eletroforético das amostras de campo identificou grande diversidade dos rotavírus na região estudada,
- a caracterização molecular dos genótipos G e P de rotavírus bovino identificou o genótipo G6P[5], como o mais frequente entre as amostras genotipadas, o que evidencia a necessidade de outros estudos para se conhecer melhor as características antigênicas desse agente,
- a distribuição temporal dos casos positivos para rotavírus demonstrou que a maioria dos casos foi detectado no período da seca e em menor escala no período da chuva, respectivamente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; ITO, N.; MORIKAWA, S.; TAKASU, M.; MURASE, T.; KAWASHIMA, T.; KAWAI, J. K.; SUGIYAMA, M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Res.**, v.144, p.250-257, 2009.

ABE, M.; ITO, N.; MASATANI, T.; NAKAGAWA, K.; YAMAOKA, S.; KANAMARU, Y.; SUZUKI, H.; SHIBANO, K.; ARASHI, Y.; SUGIYAMA, M. Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P [29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. **J. Gen. Virol.**, London, v. 92, n. 4, p. 952-960, 2011.

ALFIERI, A. F. Caracterização dos genótipos G e P de rotavírus grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela reação da polimerase em cadeia. 1999.134f. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo, 1999.

ALFIERI, A.; ALFIERI, A. A.; BARREIROS, M. A.; LEITE, J. P.; RICHTZENHAIN, L. J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 167-173, 2004.

ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F.; Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v. 38, p. 521-526, 2006.

BADARACCO, A.; GARAICOECHEA, L.; MATTHIJNSSENS, J.; LOUGE URIARTE, E.; ODEÓN, A.; BILBAO, G.; FERNANDEZ, F.; PARRA, G. I.; PARREÑO, V. Phylogenetic analyses of typical bovine rotavirus genotypes G6, G10, P[5] and P[11] circulating in Argentinean beef and dairy herds. **Infect. Genet. Evolution.** v. 18, n. 2, p. 18-30, 2013.

BARBOSA, E. F.; FIGUEIREDO, H. C. P.; GARCIA, A. M.; LOBATO, Z. I. P.; LAGE, A. P., Rotavírus do grupo A em bezerros lactentes no Estado de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 435-439, 1998.

BARREIROS, M. A.B. et al. G e P genotypes of group A rotavirus from diarrheic calves born to cows vaccinated against the NCDV P[1] G6 rotavirus strain. **J.Vet.Medicine**. Germany, v. 51, n. 3, p.104-109, 2004.

BELLINZONI, R. C.; MATTION, N.; LA TORRE, J. L.; SCODELLER, E. A. Incidence of rotavirus in beef herds in Argentina. **Res. Vet. Sci.**, Mhow, v. 42, n. 2, p. 257-259, 1987.

BLACKLOW, N. R.; GREENBERG, H. B. Viral Gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.** Boston, v. 325, n. 4, p. 252-261, 1991.

BRANDT, C. D.; KIM, H. W.; RODRIGUEZ, W. J.; THOMAS, L.; YOLKEN, R. H.; ARROBIO, J. O.; KAPIKIAN, A. Z.; PARROTT, R. H.; CHANOCK, R. M. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzymelinked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 12, n. 5, p. 976-981, 1981.

BRESEE, J.S.; GLASS, R.I.; IVANOFF, B.; GENTSCH, J.R. Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. **Vaccine**, v. 17, n. 18, p. 2201-2222, 1999.

BRIDGER, J.C. A definition of bovine rotavirus virulence. **J. Gen. Virol.**, v.75, n. 3, p. 2807-2812, 1994.

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

BROWNING, G. F.; FITZGERALD, T. A.; CHALMERS, R. M.; SNODGRASS, D. R. A novel group A rotavirus G serotype: serological and genomic characterization of equine isolate FI23. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 29, n. 9, p. 2043-2045, 1991.

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

BUZINARO, M. G.; SAMARA, S. I.; PEREIRA, E. A. S.; FUENTES, D. B.; OLIVEIRA, M. C. S. Ocorrência dos genótipos G e P de rotavírus do grupo A em bezerros de rebanhos de corte no Estado de São Paulo, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 99-105, 2009.

CAMPOS, C. O.; ALBUQUERQUE, M. C. M.; SOARES, C. C.; VOLOTÃO, E. M. SANTOS, N. Epidemiologia das gastroenterites associadas aos rotavírus e adenovírus em humanos na cidade do Rio de Janeiro no período de 1998 a 2002. **R Ci Méd Biol**, Salvador, v.2, n.1, p.21-29, 2003.

CARUZO, T. A. R.; BRITO, W. M. E. D.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M. L. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 8, p. 1040-1043, 2010.

CONNER, M. E.; MATSON, D. O.; ESTES, M. K. Rotavirus vaccines and vaccination potential. **Microbiol. and Immuno.**, v.185, p.285-337, 1994.

COOK, N.; BRIDGER, J; KENDALL, K; GOMARA, MI.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **J. Infect.**, London, v. 48, n. 4, p. 289-302, 2004.

COSTA, C. A. Ocorrência de rotavírus e outros vírus em conteúdo intestinal de frangos de corte recebidos em um laboratório de patologia aviária. São Paulo, 1992. 82 p. [Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Instituto de Ciências de Biomédicas, Univ. de São Paulo].

COSTA, P.S.S.; GRISI, S.J.F.E.; CARDOSO, D.D.P.; FIACCADORI, F.S.; SOUZA, M.B.L.D.; SANTOS, R.A.T. Manifestações clínicas e epidemiológicas das infecções por Rotavirus A. **Pediatrics** ., São Paulo, v. 26, n. 3, p. 151-158, 2004.

COSTA MENDES, V. M.; BEER, M.; PEENZE, I.; STEELE, A. D. Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in South African calves. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 31, n. 12, p. 3333-3335, 1993.

CRAWFORD, S. E.; PATEL, D. G.; CHENG, E.; BERKOVA, Z.; HYSER, J. M.; CIARLET, M.; FINEGOLD, M. J.; CONNER, M. E.; ESTES, M. K. Rotavirus viremia and extra intestinal viral infection in the neonatal rat model. **J. Virol.**, Washington, v. 80, n. 10, p. 4820-4832, 2006.

DE LEEUW, P. W.; ELLENS, D. J.; STRAVER, P. J.; VAN BALKEN, J. A.; MOERMAN, A.; BAANVINGER, T. Rotavirus infections in calves in dairy herds. **Res. Vet. Sci.**, London, v. 29, n. 2, p. 135-141, 1980.

DEEPA R, RAO CD, SUGUNA K. Structure of the extended diarrhea-inducing domain of rotavirus enterotoxigenic protein NSP4. **Arch Virol** v. 125, n. 5, p 847-859, 2007.

DHAMA, K.; CHAUHAN, R. S.; MAHENDRAN, M.; MALIK, S. V. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Vet. Res. Commun.**, Dordrecht, v. 33, n. 1, p.1-23, 2009.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 53, n. 4, p. 410-449, 1989.

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

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Rotaviruses. **Fields Virology**. Pennsylvania, p. 1917-1975, 2007.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF. J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic**. 2005.

FERNANDEZ, F.M.; CONNER, M.E.; HODGINS, D.C. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particles (VLP) vaccines. **Vaccine**, v. 16, n. 5, p. 507-516, 1998.

FIJTMAN, N. L.; BARRANDE GUY, M. E.; CORNAGLIA, E. M.; SCHUDEL, A. Variations and persistency of eletropherotypes of bovine rotavirus field isolates. **Arch. Virol.**, Vienna, v.96, n. 2, p. 275-281, 1987.

FREITAS, P. P. S.; UYEMURA, S. A.; SILVA, D. G.; SAMARA, S. I.; BUZINARO, M. G. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigenic de amostras em rebanhos leiteiros no Estado de São Paulo. **Arq. Bras.Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 63, n. 4, p.820-827, 2011.

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

GARCIA, A. ; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J. A.; ORDE, D. C.; SANZ, R.; GOMEZ, B. M.; FUENTE, R. Rotavirus and concurrent infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. **Microbiol. Infect. Dis.**, v 23, n. 3, p. 175-183, 2000.

GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B. K.; BHAN, M. K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, Washington ,v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.

GENTSCH, J. R.; LAIRD, A. R.; BIELFELT, B.; GRIFFIN, D. D.; BANYAI, K.; RAMACHANDRAN, M.; JAIN, V.; CUNLIFFE, N. A.; NAKAGOMI, O.; KIRKWOOD, C. D.; FISCHER, T. K.; PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; JIANG, B.; GLASS, R. I. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: Implications for rotavirus vaccine programs. **J. Infect. Dis.**, v. 192, n. 1, p.146–159, 2005

GERNA, G. A.; SCRAISISI, A.; ZENHLIN, L.; DIMATTEO, A.; MIRANDO, P.; PAREA, A.; BATTAGLIA, M.; MILANESE, G. Isolation in Europe of 69M-like (serotype 8) human rotavirus strains with either subgroup I or II specificity and a long RNA electropherotype. **Arch. Virol**, Vienna, v. 112, n. 1-2, p. 27-40, 1990.

GOUVEA V, GLASS RI, WOODS P, TANIGUCHI K, CLARK HF, FORRESTER B, FANG ZY. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

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

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 16, n. 3, p. 473-437, 1982.

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

HUANG, J. A.; NAGESHA, H. S.; SNODGRASS, D. R. Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 30, n. 1, p. 85-92, 1992.

ICTV - INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. **Virus Taxonomy. Virus families not assigned to an orden. Family: Reoviridae 2013.** Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 10 out. 2014.

ISHIZAKI, H.; Ohta C.; Shirahata T.; Goto H.; Taniguchi. K.; Urasawa T.; Urasawa S. 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, n. 8, p.1019-24, 1995.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; KANG, G.; GRAY, J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 259-265, 2004.

JEREZ, J.A.; CANDEIAS, J.A.N.; DURIGON, E.L.; RÁCZ, M.L. Anticorpos anti-rotavírus em bovinos. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.18, n.4, p.371-374, 1987 (a) .

JEREZ, J. A.; CANDEIAS, J. A.; NEVES; RÁCZ, M. L.; DURIGON, E. L.; RIBEIRO, L. C. Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarréicas de bezerros. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 257-7, 1987 (b).

JEREZ, J. A.; BRANDÃO, P. E. , BUZINARO, M. G.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; ITO, F. H.; SAKAI, T. 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, 2002.

KAPIKIAN, A. Z.; FLORES J.; HOSHINO, Y. Rotavirus: the major etiologic agent of severe infantile diarrhea may be controllable by a “Jennerian” approach to vaccination. **J. Infect. Dis.**, v. 153, n. 58, p. 815–22, 1986.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. (1990). The rotavirnses. In *Virology*, 2nd ed.,. Edited by B. N. Fields & D. M. Knipe. **New York: Raven Press**, p. 1353-1404.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M.(1996) Rotaviruses. In: FIELDS, B.N. Fields *Virology*, 3rd ed., vol. 2, **New York: Raven Press**. p.1657-1708.

KIM, H. J.; PARK, J. G.; MATTHIJNSSENS, J.; LEE, J. H.; BAE, Y. C.; ALFAJARO, M. M.; PARK, S. I.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 152, n. 3, p. 291-303, 2011.

LIMAS, W. A. R.; SAMANIEGO, B. F.; MORA, G. L.; RAMIREZ, O.T.; PALOMARES L. A. Genotypification of bovine group A rotavirus in México. **Vaccine**, v 27, p. 6411-6414, 2009.

LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; MASCARENHAS, J. D. P.; FREITAS, R. B.; OLIVEIRA, C. S.; BELLESI, N. & MONTEIRO, T. A. F. Epidemiology of rotavirus gastroenteritis in the Amazon region and the need for a specific vaccine. **Ciência e Cultura**, Campinas, v. 44, n. 2-3, p. 152-157, 1992.

LOURENÇO, M. H.; NICOLAS, L. C.; COHEN, J.; SCHERRER, R.; BRICOUT, F. Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. **Annales Institut Pasteur**, Paris, v. 132, n. 2, p. 161-173, 1981.

LUCCHELLI, A.; LANCE, S. E.; BARTLETT, P. B.; MILLER, G. Y.; SAIF, L. J. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **Am. J. Vet. Res.**, v. 53, n. 2, p. 169-174, 1992.

MATTHIJNSSENS, J. A.; CIARLET, M.; HEIMAN, E.; ARIJS, I.; DELBEKE, T.; MCDONALD, S. M.; PALOMBO, E. A.; ITURIZA-GOMARA, M.; MAES, P.; PATTON, J. T.; RAHMAN, M.; VAN RANST, M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **J. Virol.**, Washington, v. 82, p. 3204-3219, 2008.

MATTHIJNSSENS, J., CIARLET, M., MCDONALD, S. M., ATTOUI, H., BANYAI, K., BRISTER, J. R., BUESA, J., ESONA, M. D., ESTES, M. K., GENTSCH, J. R., ITURRIZA-GOMARA, M., JOHNE, R., KIRKWOOD, C. D., MARTELLA, V., MERTENS, P. P., NAKAGOMI, O., PARRENO, V., RAHMAN, M., RUGGERI, F. M., SAIF, L. J., SANTOS, N., STEYER, A., TANIGUCHI, K., PATTON, J. T., DESSELBERGER, U., VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Arch. Virol.** Vienna, v. 156, n. 8, p. 1397–1413, 2011.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Vet Microbiol.** Amsterdam, v. 140, n. 3-4, p. 246-55, 2010.

McNULTY, M. S.; LOGAN, E. F. Longitudinal survey of rotavirus infection in calves. **Vet. Rec.**, London, v. 113, n. 15, p. 333-335, 1983.

MEBUS, C. A., UNDERDAHL, N. R., RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J.(1969). Calf diarrhea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. University of Nebraska Research Bulletin 233, 1-6.

MEDEIROS, T.N.S.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Severe diarrhea outbreak in beef calves (*Bos indicus*) caused by G6P[11], an emergent genotype of bovine rotavirus group A. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v 34, n.8, p. 717-722, 2014.

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.**, Amsterdam, v. 31, n. 12, p. 3333-3335, 1993.

MIÑO, S.; MATTHIJNSSENS, J.; BADARACCO, A.; GARAICOECHEA, L.; ZELLER, M.; HEYLEN, E.; VAN RANST, M.; BERRANDEGUY, M.; PARREÑO, V. Equine G3P[3] rotavirus strain E3198 related to simian RRV and feline/canine-like rotaviruses based on complete genome analyses. **Vet Microbiol.**, Amsterdam, v. 161, n. 3-4, p. 239-246, 2013.

MIYAZAKI, A.; KUGA, K.; SUZUKI, T.; KOHMOTO, M.; KATSUDA, K.; TSUNEMITSU, H. Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-to-finish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. **Vet. Rec.**, London , v. 42, n. 1, p. 112-123, 2011.

MONINI, M.; BIASIN, A.; VALENTINI, S.; CATTOLI, G.; RUGGERI, F. M. Recurrent rotavirus diarrhoea outbreaks in a stud farm, in Italy. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 149, n. 1-2, p. 248-253, 2011.

OLIVEIRA FILHO, J. P.; SILVA, D. P. G.; PACHECO, M. D.; MACARINI, L. M.; RIBEIRO, M. G.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; BARROS, B. J. P.; BORGES, A. S. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. *Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro*, v. 27, n. 10, 2007.

PAPP, H.; LÁSZLÓ, B.; JAKAB, F.; GANESH, B.; DE GRAZIA, S.; MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. **Vet Microbiol.**, Amsterdam, v. 165, n. 3-4, p. 190-199, 2013.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; BARTH, O. M.; SUTMOLLER, F.; DE FARIAS, V.; VIDAL, M. N. P. Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 483-490, 1983.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; ANDRADE, Z. P.; CASTRO, L. A. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **J. Virol. Methods.**, Amsterdam, v.10, n. 1, p. 21-28, 1985.

PEREIRA, HG.; LINHARES, A.C.; CANDEIAS, J.A.; GLASS, R.I. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. **Bull. Pan. Am. Health. Organ.** v. 27, n. 3, p. 224-233, 1993.

RAHMAN, M.; DE LEENER, K.; GOEGEBUER, T.; WOLLANTS, E.; VAN DER DONCK, I.; VAN HOOVELS, L.; VAN RANST, M. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P[6] rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.41, n. 5, p. 2088-2095, 2003.

RADOSTITS, O.M.; GAY C.C.; HINCHCLIFF K.W.; CONSTABLE P.E. 2007. Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th ed. W.B. Saunders, London. 2065p.

RAMOS, A. P. D.; STEFANELLI, C. C.; LINHARES, R. E. C.; BRITO, B. G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; LIMAB, R. C.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.71, n.1-2, p. 1-8, 2000.

REYNOLDS, D.J.; MORGAN, J. H., CHANTER, N.; JONES, P. W.; BRIDGER, J. C.; DEBNEY T. G.; BUNCH, K.J. Microbiology of calf diarrhoea in souther Britain. **Vet. Rec.**, London, v. 12, n. 119, p. 34-9, 1986.

SNODGRASS, D. R.; TERZOLO, H.R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J. D.; SYNGE, B. A. Aetiology of diarrhoea in young calves. **Vet. Rec.**, London, v. 12, n. 119, p. 31-4, 1986.

SNODGRASS, D. R.; FITZGERALD, T.; CAMPBELL, I.; SCOTT, F. M. M.; ROWNING, G. F.; MILLER, F. L.; HERRING, A. J.; GREENBERG, H. B.; (1990). Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 504-507

STEELE, A. D.; VAN NIEKERK, M. C.; MPHALELE, M. J. Geographic distribution of human rotavirus VP4 genotypes and VP7 serotypes in five South African regions. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 33, n. 6, p. 1516-1519, 1995.

STEYER, A.; POLJSK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D.; MARIN, J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: Evidence of interspecies transmission and genome reassortment. **J. Gen. Virol.**, London, v. 89, n. 7, p.1690- 1698, 2008.

SWIATEK, D. L.; PALOMBO, E. A.; LEE, A.; COVENTRY, M. J.; BRITZ, M. L.; KIRKWOOD, C.D. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in

Australian calves during 2004 and 2005. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 140,n. 1-2, p. 56-62, 2010.

THEIL, K. W. McCLOSKEY, C. M. Molecular epidemiology and subgroup determination of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in dairy and beef calves. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 27, n. 1, p. 126-131, 1989.

THRUSFIELD, M. Observational studies. In: THRUSFIELD, **M. Veterinary Epidemiology**. 3 ed. Blackwell Publishing, Oxford, Reino Unido, c. 15, p. 266-288, 2005.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CASTENS, E.; ESTES, M. K.; LEMON, S.; MANILOFF, J.; MAYO, J. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses. Academic Press: New York, p.1121, 2000.

WEI S.; GONG Z.; CHE T.; GULI A.; TIAN F. Genotyping of calves rotavirus in China by reverse transcription polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods**. Amsterdan, v 189, n. 1, p. 36-40, 2013.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater**. 3 ed. Genebra: World Health Organization, 2006.

WYATT R. G.; YOLKEN, R. H.; URAUTIA, J. J.; MALTA, I.; GREENBERG, H. B.; CHANOCK, R. M.; KAPIKIAN, A. Z.; Diarrhea associated with rotavirus in rural Guatemala: a longitudinal study of 24 infantis and young children . Am. J. Trop. Med. Hyg. v. 28, n. 4, p. 325-328, 1979.

YAMAMOTO, D.; KAWAGUCHIYA, M.; GHOSH, S.; ICHIKAWA, M.; NUMAZAKI, K.; KOBAYASHI, N. Detection and full genomic analysis of G6P[9] human rotavirus in Japan. **Virus Genes.**, Boston, v. 37, n. 2, p. 215-223, 2011.

8. APÊNDICES

Etapas da eletroforese em gel de poliacrilamida para identificação de RNA de rotavírus

I - Preparo da suspensão fecal

- 1 - Identificar os tubos com os números das amostras de fezes.
- 2 - Colocar quatro pérolas de vidro em cada tubo.
- 3 - Transferir 2 mL do tampão Tris/Ca/HCl (Tris/HCl 0,1 M pH=7,3; CaCl_2 1,5 mM) para cada tubo.
- 4 - Com o auxílio de um palito de madeira, retirar pelo menos 0,25 gramas de fezes e colocar no tubo previamente identificado.
- 5 - Deixar os tubos 30 minutos à temperatura ambiente, agitando-os no mixer a cada 10 minutos.
- 7 - Iniciar a fase seguinte ou congelar o material a -20°C (no máximo por uma semana).

II - Extração do ácido nucléico

1ª Etapa

- 1 - Transferir 0,4 mL da suspensão de fezes.
- 2 - Adicionar 40 μL de SDS - 10% (Lauril Sulfato de Sódio) em cada tubo.
- 3 - Incubar em banho-maria a 37°C durante 30 minutos.
- 4 - Adicionar 0,2 mL de fenol destilado + 0,2 mL de clorofórmio.
- 5 - Deixar os tubos 15 minutos à temperatura ambiente, agitando-os a cada 5 minutos.
- 6 - Centrifugar os tubos a 3000 rpm / 10 minutos.
- 7 - Transferir o sobrenadante para tubos do tipo "eppendorf" contendo 40 μL de NaCl 20%.
- 8 - Adicionar 1,0 ml de etanol gelado em cada "eppendorf".
- 9 - Agitar os "eppendorfs" no mixer.

10 - Incubar os "eppendorfs" a -20°C por uma noite.

2ª Etapa

1 - Centrifugar a 11.000 rpm / 30 minutos.

2 - Desprezar o sobrenadante.

3 - Deixar os "eppendorfs" invertidos sobre uma estante forrada com papel filtro para secarem completamente.

4 - Ressuspender o sedimento em 15 μl do dissociador da amostra.

5 - Incubar os "eppendorfs" em banho-maria a 37°C durante 30 minutos.

6 - Iniciar a fase seguinte ou guardar os "eppendorfs" na geladeira.

III - Preparo do gel de poliacrilamida (Solução Mãe 50/1,3 ou 30/0,8)

1 - Limpar bem as placas de vidro, os espaçadores e o pente (se necessário utilizar álcool 70% para limpar as placas).

2 - Com uma das placas na posição horizontal, posicionar os espaçadores nas laterais e na extremidade inferior. Em seguida, sobrepor a outra placa.

3 - Prender a placa com auxílio de garras (duas na parte inferior e uma em cada lateral).

4 - Introduzir o pente e marcar com uma caneta a extremidade inferior do pente na placa.

5 - Vedar a extremidade inferior e as laterais da placa com ágar noble 2%.

6 - Retirar o pente.

7 - Preparar o Persulfato de Amônio (P.S.A.) 20%:

8 - Preparar o gel inferior (lower gel, gel separador):

**ATENÇÃO: A ACRILAMIDA E A BIS-ACRILAMIDA SÃO NEUROTÓXICAS
ANTES DE SOFREREM O PROCESSO DE POLIMERIZAÇÃO. TRABALHAR COM
CUIDADO, UTILIZANDO LUVAS!**

Lower Gel 7,5%

Reagentes	Volume
Acrilamida/Bis-Acrilamida 50/1,3	1,02 ml
Lower Tris 4x	1,75 ml
Água destilada	4,02 ml
P.S.A.	200 µl
TEMED	10 µl
Volume Total	7 ml

9 - Despejar o lower gel entre as placas até a marca feita com a caneta.

10 - Aguardar a polimerização.

11- Preparar o gel superior (top gel, gel de empilhamento):

Top Gel 3,5%

Reagentes	Volume
Acrilamida/Bis-Acrilamida 50/1,3	0,14 ml
Upper Tris 4x	0,5 ml
Água destilada	1,30 ml
P.S.A.	50 µl
TEMED	10 µl
Volume Total	2 ml

12 – Colocar o top gel entre as placas até a extremidade superior da placa.

13 - Colocar o pente.

14 - Aguardar a polimerização.

IV - Colocação na cuba e condições de corrida

1 - Soltar as garras da parte inferior da placa e retirar o espaçador.

2 - Com o pente voltado internamente para a parte superior da cuba, soltar as garras laterais e fixar a placa na cuba com estas mesmas garras.

- 3 - Posicionar a placa de forma que a porção que contém o pente fique acima do nível do reservatório superior da cuba.
- 4 - Vedar com ágar noble 2% o contato da placa com o reservatório superior da cuba
- 5 - Preparar o tampão de corrida (Tris/Glicina)
- 6 - Despejar o tampão nos dois reservatórios da cuba.
- 7 - Verificar a presença de bolhas na parte inferior da placa (se necessário, retirá-las com auxílio de uma agulha e seringa).
- 8 - Retirar cuidadosamente o pente para evitar o rompimento do top gel.
- 9 - Transferir 15 μ L da amostra nos "pocinhos" formados pela retirada do pente.
- 10 - Ligar o pólo negativo (preto) no reservatório superior e o pólo positivo (vermelho) no pólo inferior da cuba.
- 11 - Ligar a fonte de eletroforese e ajustar a corrente elétrica em 20 mA por placa.
- 12 - Aguardar o tempo de corrida (aproximadamente 1h a 1h30min).
- 12 - Após a saída das amostras no tampão, esperar mais 30 minutos.
- 13 - Desligar a fonte e desconectar os pólos.

V - Coloração com Nitrato de Prata

- 1 - Retirar a placa da cuba.
- 2 - Retirar as garras e remover parcialmente os espaçadores laterais.
- 3 - Com auxílio de uma faca, separar cuidadosamente as placas de vidro, sem quebrar o gel.
- 4 - Com o auxílio de um espaçador, eliminar o top gel e marcar o gel com um pequeno corte na margem superior esquerda (local de aplicação da primeira amostra).
- 5 - Apoiar a placa com o gel na caixa de coloração e retirar o gel vertendo um pouco da solução 1 (solução fixadora) sobre ele.
- 6 - Lavar o gel 3 vezes com água destilada.
- 7 - Adicionar a solução 1 (solução fixadora, solução Etanol-Ácido Acético):
- 8 - Aguardar 30 minutos.
- 9 - Iniciar o próximo passo ou retomar a coloração no dia seguinte.
- 10 - Desprezar a solução fixadora e não lavar o gel.
- 11 - Adicionar a solução 2 (solução corante, solução de Nitrato de Prata):

- 12 - Colocar a caixa de coloração no agitador orbital por uma hora.
- 13 - Desprezar a solução 2 e lavar o gel 3 vezes com água destilada.
- 14 - Adicionar a solução 3 (solução reveladora)
- 15 - Colocar a caixa de coloração no agitador orbital e controlar visualmente o tempo de revelação.
- 16 - Desprezar a solução reveladora e não lavar o gel.
- 17 - Adicionar a solução 4 (solução Ácido-Acético 5%);
- 18 - Aguardar 15 minutos.
- 19 - Desprezar a solução 4 e lavar o gel 2 vezes com água destilada.
- 20 - Adicionar a solução 5 (solução Etanol 10%):
- 21 - Examinar o gel com auxílio de transiluminação.
- 22 - Se necessário fotografar ou secar o gel.

Soluções empregadas na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida e coloração do gel.

Soluções para extração do RNA viral

– Tampão Tris/HCl (Tris/HCl 0,1M; CaCl₂ 1,5mM; pH 7,3)

Reagente	Quantidade
Tris (base)	12,114 g
CaCl ₂	0,1662 g
Água bidestilada	q.s.p. 1000 mL
HCl concentrado	q.s.p. para pH 7,3

– Sódio dodeci Isulfato a 10% (SDS 10%)

Reagente	Quantidade
Lauril sulfato de sódio	10,0 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

- NaCl 20%

Reagente	Quantidade
NaCl	20,0 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

- Dissociador da amostra

Reagente	Quantidade
SDS 10%	3,0 mL
Upper tris 4x	1,25 mL
2-mercapto-etanol	0,5 mL
Glicerol	4,0 mL
Azul de bromofenol 0,5%	100 µL
Água bidestilada	q.s.p. 10 mL

Soluções para o preparo do gel de poliacrilamida

– Acrilamida/ bisacrilamida (30/0,8)

Reagente	Quantidade
Acrilamida	30,0 g
Bisacrilamida	0,8 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

– Lower Tris 4x (0,5M Tris/HCl; pH 8,8)

Reagente	Quantidade
----------	------------

Tris (base)	18,17 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 8,8
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

– Upper Tris 4x (0,5M Tris/HCl; pH 6,8)

Reagente	Quantidade
Tris (base)	6,06 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 6,8
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

– Persulfato de amônio

Reagente	Quantidade
Persulfato de amônio	20 mg
Água bidestilada	q.s.p. 1 mL

– Gel de poliacrilamida

Reagente	Quantidade	
	Gel inferior (7,5%)	Gel superior (3,5%)
Solução mãe		
acrilamida/bisacrilamida (30/0,8)	1,70 mL	0,23 mL
Lower Tris 4x	1,75 mL	---
Upper Tris 4x	---	0,5 mL
Água bidestilada	3,34 mL	1,21 mL
Persulfato de amônio	200 µL	50 µL
TEMED	10 µL	10 µL

Soluções para o preparo do tampão de corrida

– Solução estoque Tris-glicina 4x

Reagente	Quantidade
Tris (base)	12,0 g
Glicina	57,6 g
Azida sódica 10%	10,0 mL
Água bidestilada	q.s.p. 1000 mL

– Tampão de corrida

Reagente	Quantidade
Tris glicina 4x	50 mL
Água bidestilada	200 mL

Soluções para a coloração do gel por nitrato de prata

– Etanol-ácido acético

Reagente	Quantidade
Etanol	10 mL
Ácido acético	0,5 mL
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

– Nitrato de prata 0,011M

Reagente	Quantidade
Nitrato de prata	0,185 g mL
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

– Solução reveladora

Reagente	Quantidade
NaOH	3,75 g
Formaldeído (40%)	0,95 mL
Água bidestilada	q.s.p. 125 mL

– Ácido acético 5%

Reagente	Quantidade
Ácido acético	5 MI
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

– Etanol 10%

Reagente	Quantidade
Etanol	10 mL
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL