



Universidade de Cuiabá

Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal
Área de Concentração: Saúde Animal

PATRICK RODRIGUES FLEURY CABRAL

**IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE CEPAS DE ROTAVÍRUS BOVINO DO
GRUPO A EM FEZES DE BEZERROS DE CORTE DO ESTADO DE MATO
GROSSO**

Cuiabá, 2014

PATRICK RODRIGUES FLEURY CABRAL

**IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE CEPAS DE ROTAVÍRUS BOVINO DO
GRUPO A EM FEZES DE BEZERROS DE CORTE DO ESTADO DE MATO
GROSSO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Michele Lunardi.

Cuiabá, 2014

FICHA CATALOGRÁFICA
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

C117i

Cabral, Patrick Rodrigues Fleury.

Identificação e genotipagem de cepas de rotavírus bovino do grupo a em fezes de bezerros de corte do Estado de Mato Grosso

/ Patrick Rodrigues Fleury Cabral. – Cuiabá, 2014.

36f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Universidade de Cuiabá, 2014.

“Orientador(a): Profª. Drª. Michele Lunardi.”

1. Doença Animal. 2. Doença dos Bovinos. 3. Bovinos. 4. Diarréia. 5. Rotavírus. I. Título.

Normalização e Ficha Catalográfica

Valéria Oliveira dos Anjos
Bibliotecária - CRB1/1713

PATRICK RODRIGUES FLEURY CABRAL

IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE CEPAS DE ROTAVÍRUS BOVINO DO GRUPO A EM FEZES DE BEZERROS DE CORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade de Cuiabá – UNIC, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Michele Lunardi.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Michele Lunardi-UNIC
Orientadora

Prof. Dr. Marcelo Diniz dos Santos-UNIC

Prof^a. Dra. Michelle Igarashi-UFMT

Cuiabá, _____ de _____ de 2014.

Conceito Final: _____

Dedico a Deus pelo amparo e força para construir esse sonho.

Dedico este trabalho a vocês que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los, meus pais, irmã, professores e colegas do programa do mestrado.

AGRADECIMENTOS

Minha gratidão, em primeiro lugar, a DEUS, por estar comigo em todos os momentos e iluminando-me, sendo meu refúgio e fortaleza nos momentos mais difíceis. A Ele, minha eterna gratidão;

Agradeço, especialmente, à minha família, pelo apoio para que eu concretizasse essa pesquisa: minha mãe, Abgail, meu pai Nelson e minha irmã Pryscilla sempre ao meu lado, dando-me apoio e carinho;

A minha orientadora Prof^a. Dra Michele Lunardi, que me possibilitou aprendizagens e orientação permitindo que esse momento fosse possível. Não tenho palavras para agradecer;

Ao Prof. Dr. Carlo Ralph de Musis, obrigado pelo tempo, atenção, força, amizade e incentivo;

Ao Prof. Dr. Marcelo Diniz, coordenador do Programa, muito obrigado, pela força, amizade e tempo, o qual me incentivou e ajudou a dar forma a esse sonho;

A Prof^a. Dra Michelle Igarashi pelos ensinamentos e pelo fornecimento das amostras clínicas;

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, responsável pelo Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, e toda sua equipe, pela realização das técnicas moleculares;

A secretária do mestrado Cátia Balduino pela amizade e companheirismo.

Enfim, a todos aqueles que compartilharam o trilhar de mais esse caminho percorrido, contribuindo, direta e indiretamente, para realização deste trabalho.

A todos, muito obrigado.

RESUMO

CABRAL, P. R. F. **Identificação e genotipagem de cepas de rotavírus bovino do grupo A em fezes de bezerros de corte do estado de Mato Grosso.** 2014. 36 f. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade de Cuiabá, Cuiabá, 2014.

A diarreia neonatal bovina é uma afecção multifatorial que relaciona fatores inerentes ao bezerro com outros inerentes ao ambiente, nutrição e agentes infecciosos. O objetivo deste trabalho, foi avaliar amostras de fezes de bezerros assintomáticos provenientes de rebanhos de corte de diversas propriedades ou regiões do Estado de Mato Grosso, quanto à presença do BoRV grupo A. Adicionalmente, pretendeu-se definir os genótipos G e P, por meio de RT-PCR e sequenciamento direto, para as amostras positivas triadas pela técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA). Os animais avaliados eram de ambos os sexos e apresentavam idade inferior a 30 dias. As amostras fecais foram armazenadas a -20°C. A detecção e caracterização eletroforética do conjunto genômico do BoRV-A foram obtidas pela EGPA, seguida, da RT-PCR e posteriormente sequenciamento direto dos amplicons. Por meio da técnica de triagem EGPA, com coloração de prata, três bezerros, dos 68 que tiveram amostras fecais submetidas a essa técnica, tiveram o genoma do BoRV-A identificado nas fezes através do perfil eletroforético característico dos segmentos genômicos de RNA fita dupla deste grupo de rotavírus. Das 68 amostras avaliadas quanto a presença do BoRV-A por meio da EGPA, e confirmadas por meio da RT-PCR e sequenciamento direto dos produtos obtidos, três bezerros (4,4%), apresentavam-se infectados pelos genótipos G6P[11] ou G6P[?] do BoRV-A. Sabendo-se que os genótipos que são selecionados para as vacinas inativadas atualmente utilizadas no Brasil, para controlar as infecções por BoRV-A, são selecionados a partir das cepas mais prevalentes nas localidades produtoras das vacinas (USA e Argentina), é necessário realizar o levantamento epidemiológico dos genótipos circulantes nas diversas regiões do Brasil. Somente deste modo, será possível produzir repostas vacinais mais efetivas empregando-se cepas molecularmente semelhantes àquelas identificadas a campo ou incluindo os genótipos mais prevalentes em vacinas polivalentes.

Palavras-chave: Diarreia Neonatal Bovina. Rotavírus Bovino. RT-PCR e Sequenciamento Direto.

ABSTRACT

CABRAL, P.R.F. **Identification and genotyping of bovine rotavirus strains from group A in feces of beef calves from Mato Grosso State.** 2014. 36 p. Dissertation (Master Science in Animal Bioscience) - University of Cuiaba, Cuiaba, 2014.

Bovine neonatal diarrhea is a multifactorial disease associated with factors inherent to calf as well as to environment, nutrition and infectious agents. The aim of this study was to evaluate stool specimens from asymptomatic calves from beef herds from several farms or regions of Mato Grosso, for the presence of BoRV group A. In addition, it aimed to define the G and P genotypes, by RT-PCR and direct sequencing for positive samples screened by the technique of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The evaluated animals were of both sexes and were younger than 30 days. Fecal samples were stored at -20°C. Electrophoretic detection and characterization of genomic RNA fragments of BoRV-A were obtained by PAGE, followed by RT-PCR and direct sequencing of amplicons obtained. Through the screening technique PAGE, with silver staining, fecal samples from three calves of 68 evaluated samples that had undergone these techniques had the genome BoRV-A identified in the feces by electrophoretic patterns of genomic segments of double-stranded RNA of the rotavirus group A. Of the 68 samples evaluated for the presence of BoRV-A by PAGE and confirmed by RT-PCR and direct sequencing of the products obtained, three calves (4.4%) were shown to be infected by genotypes G6P-[11] or G6P-[?] of BoRV-A. Knowing that the genotypes that are selected for inactivated vaccines currently used in Brazil to control infections by BoRV-A are selected from the most prevalent viral strains detected in the countries where vaccines are produced (USA and Argentina), epidemiological surveys are needed to identify the circulating genotypes in different regions of Brazil. Only in this way, the production of more effective vaccine responses, by employing viral strains molecularly similar to those identified in field or including the most prevalent genotypes in polyvalent vaccines, will take place.

Keywords: Neonatal Diarrhea Bovina. Bovine Rotavirus. RT-PCR and Direct Sequencing.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	DIARRÉIA NEONATAL BOVINA	11
2.2	ROTAVÍRUS BOVINO	13
2.2.1	Etiologia Viral	13
2.2.2	Sinais clínicos e diagnóstico	15
2.2.3	Tratamento e controle	17
2.2.4	Epidemiologia	18
2.3	REFERENCIAS	20
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	ARTIGO 1	28
	IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE CEPAS DE ROTAVÍRUS BOVINO DO GRUPO A EM FEZES DE BEZERROS DE CORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO	28
	RESUMO	27
	ABSTRACT	28
	INTRODUÇÃO	28
	MATERIAL E MÉTODOS	29
	RESULTADOS	30
	DISCUSSÃO	31
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil apresenta o segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de animais. Além disso, desde 2004, nosso país assumiu a liderança nas exportações, sendo responsável por um quinto da carne comercializada internacionalmente e fornecendo carne para mais de 180 países (BRASIL, 2013).

O rebanho bovino brasileiro proporciona o desenvolvimento de dois grandes segmentos que geram renda, o setor de carne e o de leite. Estima-se que os valores totais da produção desses dois setores correspondem a 67 bilhões de reais. Tal soma, aliada a presença da atividade em todos os estados brasileiros, demonstra a importância econômica e social da bovinocultura no país (BRASIL, 2013).

O clima tropical e as extensões territoriais do Brasil contribuem para esse resultado, uma vez que permitem a criação da maioria do rebanho bovino em pastagens. Além disso, o investimento em tecnologia e capacitação profissional; o desenvolvimento de políticas públicas, que permitem que o animal seja rastreado do seu nascimento até o abate; o controle da sanidade animal e segurança alimentar contribuem para que o país possa atender às exigências dos mercados rigorosos e conquistar espaço no cenário mundial (BRASIL, 2013).

Com relação à produtividade da bovinocultura, é muito pequena quando comparada a de outros países. Usando como parâmetro a taxa de abate, o Brasil possui uma taxa de 21,67%, enquanto os Estados Unidos possuem taxa de 37%. Vários fatores determinam isso, como por exemplo, a baixa sanidade e deficiências no manejo dos animais (CNA, 2005).

Anualmente, 44.600.000 de bezerros são produzidos no país demonstrando que este setor é crucial na cadeia de produção. Neste sentido o manejo neonatal inadequado, pode refletir negativamente na produtividade e no futuro desempenho dos rebanhos como fonte de carne ou leite (BRASIL, 2006; BENESI, 2008).

O Estado de Mato Grosso tem como base econômica o seu potencial agropecuário, sendo detentor do maior rebanho bovino do País, com 28.651.256 cabeças de gado em 2012 (MATO GROSSO, 2013).

Conforme Benesi (1999), diversas afecções são capazes de intervir no

segmento inicial da cadeia produtiva, tendo como exemplo a diarreia neonatal bovina. As enterites em bezerros estão entre as causas primordiais de morbidade e mortalidade nesta categoria animal e, com isso acarretam prejuízos consideráveis à pecuária (SNODGRASS; TERZOLO; SHERWOOD, 1986; KLINGENBERG; SVENSSON, 1998). Rotavírus é um dos mais frequentes patógenos envolvidos na doença (BRITO et al., 2000).

A diarreia causada pelo rotavírus é, muitas vezes, mais severa do que aquelas provocadas por outras viroses, provocando consideráveis prejuízos econômicos. Um estudo sobre o impacto das infecções entéricas na população bovina, no Brasil, concluiu que leva a um prejuízo anual de aproximadamente 100 milhões de dólares. O prejuízo econômico é devido ao atraso no crescimento, tempo e peso inadequado ao abate e, em alguns casos, até a morte dos animais infectados (SILVA et al., 2001).

Esta entidade clínica está amplamente disseminada nos rebanhos mundiais e tem sido caracterizada como síndrome, visto que decorre da relação entre fatores como a imunidade, o ambiente, a nutrição e a infecção por diferentes microrganismos com potencial patogênico (BENESI, 1999).

O objetivo deste trabalho, foi avaliar amostras de fezes de bezerros assintomáticos provenientes de rebanhos de corte de diversas propriedades ou regiões do Estado de Mato Grosso, quanto à presença do BoRV grupo A.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DIARRÉIA NEONATAL BOVINA

A pecuária bovina é de extrema importância na economia mundial. Contudo, uma ampla gama de enfermidades agudas e crônicas afetam, direta ou indiretamente, a produção animal, o bem-estar e a sanidade do rebanho. Uma dessas afecções de grande impacto na criação de bovinos é a diarreia, doença de etiologia multifatorial que afeta os rebanhos bovino de leite e corte, e que, ainda nos dias atuais, permanece como um grande desafio aos sistemas de produção (FERREIRA, 2009; SMITH, 2012).

As infecções intestinais constituem uma importante síndrome em várias espécies de animais domésticos. Particularmente nos bovinos, é importante causa de perda econômica para a cadeia produtiva, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (WHITLOCK, 1992; BUZINARO et al., 2003; NAYLOR, 2009).

A etiologia da diarreia em bovinos é complexa, representada por uma série de agentes infecciosos, como vírus, bactérias, protozoários e metazoários, além de sofrer influência de diversos fatores não infecciosos predisponentes (HALL et al., 1988; BUZINARO et al., 2003; BARTELS et al., 2010; CHOU et al., 2010).

O reconhecimento clínico da diarreia não é difícil, baseado nos sinais de diminuição da consistência das fezes e aumento da frequência de defecação, associados à desidratação, fraqueza e perda de peso (WHITLOCK, 1992).

Entretanto, a determinação do agente etiológico não é evidente a partir dessas observações, já que estes sinais clínicos são comuns em doenças causadas por diversos enteropatógenos e, além disso, a ocorrência de coinfeções não é incomum. As lesões provocadas por diferentes microrganismos também podem se apresentar indiferenciáveis, muitas vezes, mesmo no exame histopatológico (MORRIS et al., 2011). Por esta e outras razões, em todo o mundo, pesquisadores vêm tentando estudar as relações causais de diversos agentes na patogenia da diarreia em bovinos (JEREZ, 1989; FERREIRA, 2009; MORRIS et al., 2011).

Segundo Benesi (2008), a diarreia neonatal bovina é uma afecção multifatorial que relaciona fatores inerentes ao bezerro com outros ao ambiente, nutrição e agentes infecciosos. A enfermidade engloba toxinas bacterianas, inflamações

induzidas por parasitas ou bactérias, alteração das vilosidades intestinais determinadas pela ação viral ou de protozoários. Estas condições determinam uma hipersecreção intestinal e má absorção e digestão, resultando no desenvolvimento de diarreia. Devido a todos estes aspectos, essa doença é considerada uma síndrome caracterizada por alterações da função gastrointestinal, cuja manifestação principal é a diarreia, sendo responsabilizada por excessivas despesas econômicas na atividade agropecuária, pela mortalidade provocada entre os animais afetados, pelos procedimentos terapêuticos improdutivos e, particularmente, pela perda de peso e desenvolvimento retardado dos bezerros afetados. Dentre os principais agentes etiológicos envolvidos no processo, destacam-se: as bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*), os vírus (coronavírus e rotavírus bovinos) e os protozoários (*Cryptosporidium* sp. e *Eimeria* spp.), sendo que cada um destes agentes pode causar infecção isoladamente ou de forma conjunta, sendo a segunda situação a de maior ocorrência (FAGAN; DWYER; QUINLAN, 1995; JEREZ, 1997).

Além destes agentes infecciosos, outros fatores como transtornos nutricionais, hipogamaglobulinemia determinada por deficiência na ingestão de colostro, alta lotação no método de criação, fatores ambientais como alta umidade, má ventilação e acesso limitado ao sol, qualidade inadequada da dieta, também podem constituir fatores predisponentes para a doença (BOUDA; MEDINA; QUIROZ-ROCHA, 2000).

O rotavírus (BoRV) foi relatado inicialmente por Mebus et al. (1969). Na atualidade, estes agentes virais são reconhecidos como os vírus mais importantes envolvidos na etiologia das diarreias neonatais dos bezerros (BABIUK; SABARA; HUDSON, 1985; SNODGRASS; TERZOLO; SHERWOOD, 1986; ESTES, 1996).

Uma vez que os animais jovens têm maior percentagem de líquido extracelular, o quadro se apresenta como mais grave nesta categoria animal. Existem três mecanismos de mudança da capacidade absorptiva e de secreção da mucosa intestinal que envolve mudança da função da mucosa do sistema digestivo. A primeira, chamada de hipersecreção passiva, é criada por fatores hemodinâmicos, inflamação ou por substâncias osmótico-ativas, como lactose mal digerida, ocasionando uma diarreia nutricional. A segunda tem por nome hipersecreção ativa, sendo determinada por toxinas bacterianas oriundas de *E coli* e *Salmonella* spp. Finalmente, a perda da absorção e da capacidade de reabsorção de água e

eletrólitos, normalmente é causada por coronavírus e rotavírus (BOUDA; MEDINA; QUIROZ-ROCHA, 2000).

Geralmente as mudanças do metabolismo e do equilíbrio ácido-básico são resultantes das perdas de fluidos e eletrólitos, como íons sódio (hiponatremia), cloro (hipocloremia) e de potássio, que em particular cursa com hipocalemia. As perdas mais graves conduzem a progressiva hipovolemia e hemoconcentração. A hipoglicemia frequentemente ocorre em casos mais graves de diarreia, por ocorrer aumento do catabolismo, além de evoluir para desvio do equilíbrio ácido-básico, com manifestação da acidose metabólica (LEAL et al., 2008).

É importante destacar que a morte das células epiteliais do intestino proporciona a perda de líquido da corrente sanguínea para a luz intestinal por diferença de osmolaridade, assim ocorrendo a diarreia e consequente desidratação do animal (MAGALHÃES et al., 1991).

As diarreias em animais neonatos constituem-se numa entidade mórbida de distribuição mundial com graves prejuízos à exploração econômica racional dos animais de produção, sobretudo quanto às perdas por mortalidade, aumento na conversão alimentar, custos com tratamentos e profilaxia, somando-se a este quadro o diagnóstico dos agentes das gastroenterites, inseridos num contexto epidemiológico. Pode-se também se justificar a necessidade deste diagnóstico por constituírem-se como zoonoses (KANEENE; HURD, 1990).

2.2 ROTAVÍRUS BOVINO

2.2.1 Etiologia Viral

O rotavírus é considerado um importante agente etiológico da gastroenterite viral aguda em animais jovens e em crianças, em todo o mundo, principalmente no período do inverno (WHITLOCK, 1992; BUZINARO et al., 2003;).

O rotavírus pertence à família *Reoviridae*, tem o genoma segmentado formado por 11 segmentos de RNA de cadeia dupla, e ao redor do genoma o capsídeo é formado por três camadas de proteínas (ESTES; COHEN, 1989).

Além das seis proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7), o genoma do rotavírus também codifica seis proteínas não estruturais (NS1-6). Os segmentos do genoma podem ser 11 diferenciados pelo tamanho por eletroforese em gel e estes

eletroferotipos padrões são utilizados para caracterizar isolados (SAIF, 2011). As proteínas do capsídeo externo VP4 (codificada pelo segmento genômico 4) e VP7 (codificada pelo segmento 9), suscitam a produção de anticorpos neutralizantes. A base da classificação viral em sorotipos ou genótipos específicos é definida por essas proteínas ou pelos genes que as codificam (SAIF, 2011; TANIGUCHI; URASAWA; URASAWA, 1993).

Os rotavírus podem ser classificados em sete sorogrupos (A-G) e em sorotipos, de acordo com as proteínas VP4 (tipo P) e VP7 (tipo G) (BULGIN et al., 1989; BUZINARO et al., 2000; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

O uso de técnicas e práticas imunológicas, como o ensaio imunoenzimático (ELISA) (BELLINZONI et al., 1989), e métodos moleculares, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (GOUVEA et al., 1990), permite a definição das características antigênica e molecular de cepas de rotavírus bovino.

A diarreia viral induzida pela infecção pelo rotavírus ocorre em várias espécies animais, incluindo o homem. Bezerros e humanos são usualmente infectados pelo grupo A. Os rotavírus do grupo B são isolados de vacas adultas com diarréia. Bezerros neonatos, com menos de 14 dias de idade, são os mais suscetíveis ao contágio por rotavírus e muitas infecções ocorrem durante a primeira semana de vida. A taxa de morbidade observada pode ser alta, entre 50 e 100%, e a mortalidade é variável (GATTI; HARA; FERRAZ, 1989; REBHUN; GUARD; RICHARDS, 1995).

A grande quantia de partículas virais excretadas nas fezes dos animais infectados, e a resistência das partículas ao meio ambiente, favorecem a propagação ambiental e o ciclo de infecção nos rebanhos (BRIDGER, 1994). Além da resistência da partícula viral, aspectos ligados ao ambiente, manejo, nutrição e estado imunológico dos animais constituem elementos de risco para bezerros provenientes de rebanhos leiteiros, e podem colaborar para expandir a incidência da rotavirose nos rebanhos (REYNOLDS et al., 1986; LAGONI, 1988; FERNANDES et al., 1998).

Por meio da infecção por via oral, o rotavírus replica nas células epiteliais diferenciadas das vilosidades intestinais, com consequente substituição desses enterócitos por outros imaturos das criptas do intestino delgado (FERREIRA, 2009; CHOU et al., 2010). A infecção se inicia com a replicação nas células epiteliais e, à medida que a multiplicação progride, as células absortivas são eliminadas e as

células imaturas das criptas cobrem a superfície da vilosidade, gerando mudança brusca na relação entre absorção e secreção, que resulta em diarreia malabsortiva, com acúmulo de fluidos no lúmen intestinal (FERREIRA, 2009). Há evidências de que a infecção concomitante pelo *Cryptosporidium* spp. agrava o quadro de diarreia causada pelo rotavírus (HALL, 1988; ALFIERI et al., 1994; SCOTT et al., 2008). De acordo com Whitlock (1992), a infecção pelo rotavírus predispõe à colonização pela *Escherichia coli* enterotoxigênica (ECET), levando à infecção mista de um mesmo enterócito.

Ressalta-se que as células infectadas são destruídas, levando a atrofia parcial da vilosidade intestinal. As vilosidades atrofiadas são rapidamente recobertas com células da cripta relativamente indiferenciadas que amadurecem em poucos dias e resultam na cicatrização da lesão. Os bezerros necessitam de 10 a 21 dias para recuperação total a uma taxa de crescimento normal. Vale lembrar que a replicação viral pode ser evitada pela ingestão de colostro com anticorpos neutralizantes com título maior ou igual a 1:1.024 (RAMIG, 2004).

2.2.2 Sinais clínicos e diagnóstico

Não existem sinais patognomônicos de rotavirose em bezerros que permitam diferenciar de ECET ou outros patógenos. Depressão, diminuição de resposta de sucção, diarreia e desidratação são os sinais clínicos mais frequentes. Febre, salivação e decúbito podem ser considerados em alguns casos. Fezes aquosas e amarelas são também características. Devido à diversidade de agentes que podem agir juntos, a cor, a consistência e composição das fezes tem uma grande variação. Sinais como depressão, desidratação e choque são mais comuns em bezerros jovens, com menos de cinco dias de idade e também naqueles com mais de duas semanas (RADOSTITS et al., 2000).

O diagnóstico requer o reconhecimento de partículas de rotavírus nos bezerros com infecção aguda. As fezes devem ser coletadas nas primeiras 24 horas da doença ou no começo da diarreia. Pode ser realizado o exame por microscopia eletrônica ou teste de ELISA para detectar o antígeno viral (BRANDT et al.; 1987; REBHUN; GUARD; RICHARDS, 1995).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), apesar de ser uma técnica de alta especificidade, é bastante complexa e demorada, principalmente quando se

dispõe de um número grande de amostras, como acontece, por exemplo, em casos de surtos. Nesse sentido, o desenvolvimento da técnica de ELISA, com alta sensibilidade e especificidade, fácil de ser automatizada, rápida e segura, contribui para se avaliar a ocorrência de rotavírus em animais de produção, particularmente em suínos e bovinos leiteiros, através da sua aplicação a estudos epidemiológicos essenciais ao delineamento de medidas profiláticas (YOLKEN; WILDE, 1994; MUNFORD, 1995).

Para o diagnóstico laboratorial de rotavírus, a técnica mais utilizada é a EGPA, na qual se busca evidenciar a presença dos 11 segmentos de RNA dos rotavírus diretamente de extratos de RNA isolados de amostras fecais, sendo esta uma técnica de alta especificidade analítica, mas trazendo a desvantagem de demandar dois dias de trabalho para a geração de resultados e de ter baixa sensibilidade analítica, uma vez que é necessária uma grande quantidade de rotavírus nas fezes para a geração de sinal quando comparada, por exemplo, à RT-PCR para detecção de rotavírus (HERRING et al., 1982; XU; HARBOUR; MCCRAE, 1990; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Uma técnica que já foi largamente utilizada para a detecção de rotavírus é a microscopia eletrônica, que apresenta uma elevada especificidade, pois os rotavírus são facilmente identificados devido a sua morfologia característica (ATHANASSIOUS et al., 1994; ESTES; KAPIKIAN, 2007). Entretanto, a microscopia eletrônica tem a desvantagem de ter baixa sensibilidade quando comparada com outros testes, como o ELISA e a transcrição reversa seguida da PCR (RT-PCR) (DENNEHY; GAUNTLETT; SPANGENBERGER, 1990; BUESA et al., 1996). Além disso, poucos laboratórios são equipados para a realização da microscopia eletrônica.

Com relação às reações sorológicas, a técnica de ELISA é a mais largamente utilizada, em função de sua alta sensibilidade e da possibilidade de automação, permitindo o processamento de um grande número de amostras simultaneamente (PEREIRA et al., 1985; YOUKEN; WILDE, 1994; GREGORI, 2003).

A aglutinação em látex, embora seja uma técnica rápida, simples e de alta especificidade, tem a desvantagem de ter baixa sensibilidade dependendo do estágio da doença (BRANDT et al., 1987).

Outras técnicas sorológicas, como a imunofluorescência, a imunomicroscopia eletrônica (BRIDGER; WOODE, 1975), radioimunoensaio (CUCKOR; BERRY;

BLACKLOW, 1978) e contraímunoelctroforese (CANDEIAS; ROSENBURG; RÁCZ, 1978) podem ser utilizadas para detecção dos rotavírus, mas também dependem da produção de imunorreagentes e, portanto, de isolamento e produção de vírus em cultivos celulares (RANGEL FILHO; LIMA, 1987).

A RT-PCR tornou-se um método essencial no estudo dos rotavírus, não apenas para a simples detecção de presença ou ausência do vírus, mas, principalmente, para a classificação de genótipos de amostras positivas em ELISA ou EGPA, existindo um diverso e complexo conjunto de variações de combinações de primers (GOUVEA et al., 1990; GREGORI, 2003; PANG et al., 2004).

Além disso, a RT-PCR para detecção de rotavírus, tem demonstrado ser uma técnica de elevada sensibilidade quando comparada com o ELISA (BUESA et al., 1996), microscopia eletrônica (PANG et al., 2004) e EGPA (BUESA et al., 1996).

Comparações entre as sensibilidades analíticas da RT-PCR e nested RT-PCR com a do ELISA, por exemplo, demonstraram que as primeiras podem ser 100 e 1000 vezes superiores, respectivamente (WILDE; EIDEN; YOLKEN, 1990; HUSSAIN; SETH; BROOR, 1995; BUESA et al., 1996).

Comparando a sensibilidade analítica de uma nested RT-PCR com a RT-PCR em tempo real, com a utilização de um mesmo conjunto de primers para rotavírus, encontrou-se limiar de detecção 100 vezes maior na última (PANG et al., 2004), sugerindo-se que este resultado tenha sido influenciado pela otimização das concentrações de primers e sondas de modo que se permitisse maior eficiência na amplificação. Uma variação da PCR, denominada de multiplex PCR, tem sido utilizada no diagnóstico de diarreias virais em amostras fecais de suínos (KIM et al., 2000; SONG et al., 2006; KIM et al., 2007; OGAWA et al., 2009), de aves (SPACKMAN; KAPCZYSKI; SELLERS, 2005) de humanos (O'NEILL et al., 2002; ROHAYEM et al., 2004), e de bovinos (BRIDGER, 1975; BRITO, 1998; BRITO et al., 2000; ALFIERI et al., 2004; CARUZO et al., 2010; SILVA et al., 2012).

2.2.3 Tratamento e controle

O tratamento não é específico e segue a terapia para ECET, existindo algumas diferenças, como o fato de hidratação oral não ser indicada, pois como ocorreu lesão celular intestinal não ocorrerá absorção. É essencial o acompanhamento do bezerro, terapia de hidratação parenteral e antibioticoterapia

para infecções secundárias (RADOSTITS et al., 2002).

As medidas de controle que possam vir a diminuir a exposição do neonato ao agente, como imunização das vacas secas com vacinas de rotavírus inativado e manejo adequado do colostro ao neonato, são eficazes para diminuição da casuística, sendo este controle similar aquele utilizado para o ECET (BITTENCOURT; RÁCZ, 1992; REBHUN; GUARD; RICHARDS, 1995).

2.2.4 Epidemiologia

De acordo com Estes (1996), dentre os agentes virais, o gênero *Rotavirus* constitui-se na maior causa de gastroenterite infecciosa em crianças e animais recém-nascidos, tendo uma distribuição geográfica mundial (ACHA; SZYFRES, 1986).

Estudos epidemiológicos realizados em vários países apontam os rotavírus como agentes etiológicos importantes das enterites que afetam os bezerros principalmente nas primeiras semanas de vida (WOODE; BRIDGER, 1975; DELEEW et al., 1980; FIJTMAN et al., 1987; LUCHELLI et al., 1992; ARCANGELETTI et al., 2005).

No Brasil, investigações conduzidas por pesquisadores de diferentes regiões do país foram capazes de associar o rotavírus bovino com quadros de diarreia aguda em bezerros. Em muitos destes estudos, além da detecção do vírus em amostras de fezes diarréicas, obteve-se a realização da caracterização molecular por meio da PCR (BRITO et al., 2000; ALFIERI et al., 2004; CARUZO et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Quando da investigação de um surto de diarreia neonatal em bezerros com menos de 30 dias de idade, pertencentes a duas propriedades leiteiras do município de Hidrolândia, Goiás, foram obtidas as características eletroforéticas (EGPA), sorológicas (ELISA) e genotípicas (nested RT-PCR) de dez amostras fecais positivas para a presença do vírus (BRITO et al., 2000). Alfieri et al. (2004) também avaliaram as características genotípicas de amostras diarreicas de bezerros colhidas entre 1996 e 1999. As 44 amostras que foram avaliadas e genotipadas por Multiplex nested RT-PCR foram previamente triadas para a presença do BoRV do grupo A por ELISA e EGPA. Uma vez que as amostras fecais pertenciam a bezerros oriundos de oito rebanhos de leite e de corte de quatro Estados das regiões Centro-Oeste (MS-

GO), Sudeste (SP) e Sul (PR), o estudo confirmou a presença do vírus em associação com casos de diarreia nos animais e pode identificar genótipos diferentes dos usualmente presentes em vaciniais (ALFIERI et al., 2004).

Outro estudo verificou a presença do BoRV por ELISA em 203 amostras de fezes diarreicas de bezerros com menos de 30 dias de 12 rebanhos do Estado de São Paulo. A detecção do BoRV foi realizada em 25,1% das amostras, e em outras 36 amostras (17,7%) em associação com *Cryptosporidium*. Além destes dois agentes, outros foram pesquisados, porém identificados em uma menor proporção das amostras (LANGONI et al., 2004).

Caruzo et al. (2010) avaliaram 331 amostras fecais de bezerros com menos de 30 dias de uma propriedade de leite do Estado de Goiás. A presença do BoRV foi verificada em 9,9% das amostras avaliadas por ELISA, PAGE e Multiplex semi-nested RT-PCR, sendo que em considerável proporção destas, foi identificada infecções mistas, com mais de um genótipo diferente do vírus.

Em 2012, fezes de bezerros de 65 propriedades de leite e de corte pertencentes a quatro estados do país (SP, MG, GO e MS) foram submetidas à detecção do rotavírus por PAGE e Multiplex semi-nested RT-PCR, sendo que o agente pode ser detectados em 5,05% das amostras estudadas (SILVA et al., 2012).

2.3 REFERENCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud, 1986. p. 986-7.

ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E. Frequency of rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, p. 521-26, 2006.

ALFIERI, A. et al. Ocorrência de *E. coli*, Rotavírus, Picobirnavírus e Cryptosporidium em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **Semina (Ciências Agrárias)**, v. 15, n. 3, p. 5-7, 1994.

ALFIERI, A. F. et al. Genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 167-73, 2004.

ARCANGELETTI, M. C. et al. Electron microscopy as a reliable tool for rapid and conventional detection of enteric viral agents: a five-year experience report. **Acta Biomedica**, v. 75, p. 165-70, 2005.

ATHANASSIOUS, R. et al. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 163-9, 1994.

BABIUK, L. A.; SABARA, M.; HUDSON, G. R. Rotavirus and coronavirus infections in animals. **Progress in Veterinary Microbiology and immunology**, v. 1, p. 80-120, 1985.

BARTELS, C. J. M. et al. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal feces of Young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, p. 162-9, 2010.

BELLINZONI, R. C. et al. Serological characterization of bovine rotaviruses isolated from dairy and beef herds in Argentina. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2619-23, 1989.

BENESI, F. J. **Principais enfermidades de bezerros neonatos: como diagnosticá-las e tratá-las**. 2008. Disponível em: <<http://www.spmv.org.br/.../Neonatologia%20%20Fernando%20Jose%20Benesi.doc>>. Acesso em: 25 fev. 2014.

BENESI, F. J. Síndrome diarreia dos bezerros. **Revista CRMV-ES**, v. 2, n. 3, p. 10-3, 1999.

BITTENCOURT, M. J.; RÁCZ, M. L. Electrophoretic study of the genome of porcine rotaviruses from São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 23, p. 149-51, 1992.

BOUDA, J; MEDINA, M.; QUIROZ-ROCHA, G. Diarreia no bezerro: etiopatogenia, tratamento e prevenção. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; BORGES, J. B.; CECIM, M. **Uso**

de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais dos bovinos. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2000.

BRANDT, C. D. et al. Evaluation of a latex test for rotavirus detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 9, p. 1800-1802, 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Bovinos e bubalinos.** Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acesso em: 13 de abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Censo Agropecuário, 2006.** Brasília, DF: ESALQ, 2007. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Ministerio/Publicacao_v2.pdf>. Acesso em: 25 fev. 2014.

BRIDGER, J. C. A Definition of bovine rotavirus virulence. **Journal General Virology**, v. 75, p. 2807-12, 1994.

BRIDGER, J. C.; WOODE, G. N. Neonatal calf diarrhea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. **British Veterinary Journal**, v. 31, p. 528-35, 1975.

BRITO, W. M. E. D. **Caracterização sorológica e molecular de amostras de rotavírus bovino do Estado de Goiás.** 1998. 211 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BRITO, W. M. E. D. et al. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 31, p. 140-5, 2000.

BUESA, J. et al. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. **Research in Virology**, v. 146, n. 6, p. 353-61, 1996.

BULGIN, M. S. et al. Detection of rotavirus and coronavirus shedding in two beef cow herd in Idaho. **Canadian Veterinary Journal**, v. 30, p. 235-9, 1989.

BUZINARO, M. G. et al. Prevalence of group A rotavirus in diarrheic feces of beef calves in semi-intensive production system. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 266-70, 2003.

BUZINARO, M. G.; MUMFORD, V.; BRITO, V. M. E. D. Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 555-61, 2000.

CANDEIAS, J. A. N.; ROSENBERG, C. P.; RÁCZ, M. L. Identificação por contraímueletroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. **Revista de Saúde Pública**, v. 12, p. 99-103, 1978.

CARUZO, T. A. R. et al. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus

strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1040-3, 2010.

CHOU, W. C. et al. Modeling the impact of climate variability on diarrhea-associated diseases in Taiwan (1996-2007). **Science of The Total Environment**, v. 409, p. 43-51, 2010.

CNA. **Fórum nacional permanente da pecuária de corte-Balanco da pecuária bovina de corte 2003-2006**. Disponível em:

<<http://www.cna.org.br/site/desvio.php?ag=0&a=480>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

CUCKOR, G.; BERRY, M. K.; BLACKLOW, N. R. Simplified radioimmunoassay for detection of human rotavirus in stools. **Journal of Infectious Diseases**, v. 138, p. 906-10, 1978.

DELEEW, P. W. et al. Rotavirus infection in calves in dairy herds. **Research in Veterinary Science**, v. 29, p. 135-41, 1980.

DENNEHY, P. H.; GAUNTLETT, D. R.; SPANGENBERGER, S. E. Choice of reference assay for detection of rotavirus in fecal specimens: electron microscopy versus enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1280-3, 1990.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Disponível em

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/BovinoCorte/BovinoCorteRegiaoCentroOeste/#>> Acesso em: 15 mar. 2014.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. 2950 p.

ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiology Reviews**, v. 53, p. 410-49, 1989.

ESTES, M.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: **Fields Virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007. cap. 53, p. 1918-76.

FAGAN, J. G.; DWYER, P. J.; QUINLAN, J. G. Factors that may affect the occurrence of enteropathogens in the feces of diarrheic calves in Ireland. **Irish Veterinary Journal**, v. 48, p. 17-21, 1995.

FERNANDEZ, F. M. et al. 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, p. 507-16, 1998.

FERREIRA, M. G. **Prevalência dos principais enteropatógenos em bezerras da fase de aleitamento em explorações leiteiras semi-intensivas de duas bacias leiteiras do Estado de Minas Gerais**. 2009. 80 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FIJTMAN, N. L.; BARRANDEGUY, M. E.; CORNAGLIA, E. M. Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. **Archives of Virology**, v. 96, p. 275-81, 1987.

GATTI, S. M. V. et al. Presence of group A and non-A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, SP, Brazil. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 178, p. 347-9, 1989.

GAWA, H. et al. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiplex infections. **Journal of Virological Methods**, v. 160, p. 210-4, 2009.

GOUVEA, V. et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, p. 276-82, 1990.

GREGORI, F. **Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criação de suínos, localizadas no estado de São Paulo**. 2003. 139 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

HALL, G. A. Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. **Research in Veterinary Science**, v. 45, p. 240-50, 1988.

HERRING, A. J. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acids in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, p. 473-7, 1982.

HOUSE, J. A. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, p. 1118-24, 1978.

HUSSAIN, M.; SETH, P.; BROOR, S. Detection of group A rotavirus by reverse transcription polymerase reaction in feces from children with acute gastroenteritis. **Archives Virology**, v. 140, p. 1225-33, 1995.

JEREZ, J. A. Diarreias virais dos bezerros: rotavírus e coronavírus. **Biológico**, v. 59, n. 2, p. 33-7, 1997.

JEREZ, J. A. et al. Tipos eletroforéticos de rotavírus bovino. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 2, p. 254-7, 1989.

KANEENE, J. B.; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III - Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 127-40, 1990.

KIM, O. et al. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhoea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical samples by multiplex RT-PCR. **Veterinary Record**, v. 146, p. 637-40, 2000.

KIM, S. H. et al. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and

quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. **Journal of Virological Methods**, v. 146, p. 172-7, 2007.

KLINGENBERG, V.; SVENSSON, L. Group A rotavirus as a cause of neonatal calf enteritis in Sweden. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 39, p. 195-9, 1998.

LANGONI, H. et al. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 313-9, 2004.

LANGONI, H. Isolamento e testes de placas para uma amostra de rotavírus bovino. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 225-30, 1988.

LEAL, M. L. R. Modelo de indução de diarreia osmótica em bezerros holandeses. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782008000600024&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 20 fev. 2014.

LUCHELLI, A.; LANCE, S. E.; BARTLETT, P. B. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **American Journal of Veterinary**, v. 53, p. 169-74, 1992.

MAGALHÃES, H.; FREITAS, M. A.; GONÇALVES, W. M. Ocorrência, aspectos bacteriológicos e histopatológicos da colibacilose de bezerros. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 29, p. 555-64, 1991.

MATO GROSSO. Instituto de Defesa Agropecuária do Estado de Mato Grosso (INDEA-MT). **Fechamento da etapa de vacinação contra febre aftosa etapa Nov/2012**. Cuiabá, 2013. Disponível em: <http://www.indea.mt.gov.br/arquivos/A_2e76cdcf61d8afb89fb011a74976613bRCVF A-11-2012-MUNICIPIOS.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2013.

MEBUS, C. A. et al. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from field outbreak. **Nebraska Agricultural Experiment Station Bull**, n. 233, p. 1-16, 1969.

MEBUS, C. A. et al. Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation and characteristics of a corona-like agent. **American Journal of Veterinary**, v. 34, p. 173-8, 1973.

MEBUS, C. A. et al. Neonatal calf diarrhea: results of a field trial using a reo: like virus vaccine. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**, v. 67, p. 173-8, 1972.

MORRIS, W. E. et al. Mercado E.C. & Fernandez-Miyakawa M.E. Necrotic Enteritis in Young Calves. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, p. 254-9, 2011.

MUNFORD, V. **Cultivo e caracterização sorológica de rotavírus bovino no Estado de São Paulo**. 1995. 98 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

NAYLOR, J. M. Neonatal calf diarrhea. In: _____. **Current veterinary therapy: Food animal practice**. 5. ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2009. cap. 21, p. 70-7.

- O'NEILL, H. J. et al. Clinical utility of nested multiplex RT-PCR for group F adenovirus, rotavirus and Norwalklike viruses in acute viral gastroenteritis in children and adults. **Journal of Clinical Virology**, v. 25, p. 335-43, 2002.
- PANG, X. L. et al. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. **Journal of Medical Virology**, v. 72, p. 496-01, 2004.
- PEREIRA, H. G. et al. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **Journal of Virological Methods**, v. 10, p. 21-8, 1985.
- RADOSTITIS, O. M. et al. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. cap. 3, p. 769-802.
- RAMIG, R. F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **Journal of Virology**, v. 78, p. 1213-20, 2004.
- RANGEL FILHO, F. B.; LIMA, J. G. P. Rotavírose diarreica em bezerros tipo leiteiro no Estado do Espírito Santo, Brasil. I. Estudos de imunofluorescência. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 35-7, 1987.
- REBHUN, W. C.; GUARD, C.; RICHARDS, C. M. **Diseases of dairy cattle**. Baltimore: Williams & Wilkins; The clinical examination, 1995. p.1-10.
- REYNOLDS, D. J. et al. Microbiology of calf diarrhea in southern Britain. **Veterinary Record**, v. 12, p. 34-9, 1986.
- ROHAYEM, J. et al. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect norovirus, astrovirus and adenovirus in clinical stool samples. **Journal of Virological Methods**, v. 118, p. 49-59, 2004.
- SAIF, L. J. Reoviridae. In: MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. **Fenner's veterinary virology**. 4. ed. London: Academic Press, 2011. cap. 24, p. 275-91.
- SCOTT, P. R. et al. Diarreia dos bezerros. In: ANDREWS, A. H. et al. **Medicina Bovina: doenças e criação de bovinos**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 162-89.
- SILVA, R. R. et al. Pesquisa de rotavírus em bezerros bovinos no município de Igarapé-açu (PA). **Revista Ciência Agrária**, n. 36, p. 121-9, 2001.
- SILVA, F. D. F. et al. Molecular characterization of group A bovine rotavirus in southeastern and central-western Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 237-42, 2012.
- SMITH, D. R. Field disease diagnostic investigation of neonatal calf diarrhea. **Veterinary Clinics Food Animal**, v. 28, p. 465-81, 2012.
- SNODGRASS, D. R.; TERZOLO, H. R.; SHERWOOD, D. A etiology of diarrhea in young calves. **Veterinary Record**, v. 119, p. 31-4, 1986.
- SONG, D. S. et al. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection

of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus and porcine group A rotavirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 278-81, 2006.

SPACKMAN, E.; KAPCZYSKI, D.; SELLERS, H. Multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of three viruses associated with poult enteritis complex: turkey astrovirus, turkey coronavirus, and turkey reovirus. **Avian Diseases**, v. 49, p. 86-91, 2005.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA S. Independent segregation of the VP4 and the VP7 genes in bovine rotaviruses as confirmed VP4 sequence analysis of G8 and G10 bovine rotavirus strains. **Journal of General Virology**, v. 74, p. 1215-21, 1993.

WHITLOCK, R. H. Diarrhea in Cattle. In: ANDERSON, N. V. **Veterinary Gastroenterology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. cap. 31, p. 755-802.

WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1300-7, 1990.

WOODE, G. N.; BRIDGER, J. C. Viral enteritis of calves. **Veterinary Record**, v. 96, p. 85-8, 1975.

XU, L.; HARBOUR, D.; MCCRAE, M. A. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. **Journal of Virological Methods**, v. 27, n. 1, p. 29-37, 1990.

YOLKEN, R. H.; WILDE, J. A. Assays for detecting human rotavirus. In: KAPIKIAN, A.Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. 785 p.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar amostras de fezes de bezerros assintomáticos provenientes de rebanhos de corte de diversas propriedades ou regiões do Estado de Mato Grosso, quanto à presença do RV grupo A.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Triar as amostras fecais selecionadas para o estudo quanto a presença do BoRV-A por meio da técnica de EGPA;

Submeter as amostras positivas para o BoRV-A no EGPA à RT-PCR;

Genotipar os produtos obtidos na RT-PCR por meio do sequenciamento dos fragmentos obtidos na amplificação.

4 ARTIGO 1

IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE CEPAS DE ROTAVÍRUS BOVINO DO GRUPO A EM FEZES DE BEZERROS DE CORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO

Identificação e genotipagem de cepas de rotavírus bovino do grupo a em fezes de bezerros de corte do Estado de Mato Grosso

Identification and genotyping of bovine rotavirus strains from group a in feces of beef calves from Mato Grosso State

Resumo

A diarreia neonatal bovina é uma afecção multifatorial que relaciona fatores inerentes ao bezerro com outros inerentes ao ambiente, nutrição e agentes infecciosos. O objetivo deste trabalho, foi avaliar amostras de fezes de bezerros assintomáticos provenientes de rebanhos de corte de diversas propriedades ou regiões do Estado de Mato Grosso, quanto à presença do BoRV grupo A. Adicionalmente, pretendeu-se definir os genótipos G e P, por meio de RT-PCR e sequenciamento direto, para as amostras positivas triadas pela técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA). Os animais avaliados eram de ambos os sexos e apresentavam idade inferior a 30 dias. As amostras fecais foram armazenadas a -20°C. A detecção e caracterização eletroforética do conjunto genômico do BoRV-A foram obtidas pela EGPA seguida, da RT-PCR, e posteriormente, sequenciamento direto dos amplicons. Por meio da técnica de triagem EGPA, com coloração de prata, três bezerros, dos 68 que tiveram amostras fecais submetidas a essa técnica, tiveram o genoma do BoRV-A identificado nas fezes através do perfil eletroforético característico dos segmentos genômicos de RNA fita dupla deste grupo de rotavírus. Das 68 amostras avaliadas quanto a presença do BoRV-A por meio da EGPA, e confirmadas por meio da RT-PCR e sequenciamento direto dos produtos obtidos, três bezerros (4,4%), apresentavam-se infectados pelos genótipos G6P[11] ou G6P[?] do BoRV-A. Sabendo-se que os genótipos que são selecionados para as vacinas inativadas atualmente utilizadas no Brasil, para controlar as infecções por BoRV-A, são selecionados a partir das cepas mais prevalentes nas localidades produtoras das vacinas (USA e Argentina), é necessário realizar o levantamento epidemiológico dos genótipos circulantes nas diversas regiões do Brasil. Somente deste modo, será possível produzir repostas vacinais mais efetivas empregando-se cepas molecularmente semelhantes àquelas identificadas a campo ou incluindo os genótipos mais prevalentes em vacinas polivalentes.

Palavras-chave: Diarréia Neonatal Bovina, Rotavírus Bovino, RT-PCR, Sequenciamento Direto

Abstract

Bovine neonatal diarrhea is a multifactorial disease associated with factors inherent to calf as well as to environment, nutrition and infectious agents. The aim of this study was to evaluate stool specimens from asymptomatic calves from beef herds from several farms or regions of Mato Grosso, for the presence of BoRV group A. In addition, it aimed to define the G and P genotypes, by RT-PCR and direct sequencing for positive samples screened by the technique of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The evaluated animals were of both sexes and were younger than 30 days. Fecal samples were stored at -20°C. Electrophoretic detection and characterization of genomic RNA fragments of BoRV-A were obtained by PAGE, followed by RT-PCR and direct sequencing of amplicons obtained. Through the screening technique PAGE, with silver staining fecal samples from three calves of 68 evaluated samples that had undergone these techniques had the genome BoRV-A identified in the feces by electrophoretic patterns of genomic segments of double-stranded RNA of the rotavirus group A. Of the 68 samples evaluated for the presence of BoRV-A by PAGE and confirmed by RT-PCR and direct sequencing of the products obtained three calves (4.4%) were shown to be infected by genotypes G6P-[11] or G6P-[?] of BoRV-A. Knowing that the genotypes that are selected for inactivated vaccines currently used in Brazil to control infections by BoRV-A, are selected from the most prevalent viral strains detected in the countries where vaccines are produced (USA and Argentina), epidemiological surveys are needed to identify the circulating genotypes in different regions of Brazil. Only in this way, the production of more effective vaccine responses, by employing viral strains molecularly similar to those identified in field or including the most prevalent genotypes in polyvalent vaccines, will take place.

Keywords: Bovine Rotavirus, Direct Sequencing, Neonatal Diarrhea Bovina, RT-PCR

Introdução

A diarreia neonatal bovina é uma afecção multifatorial que relaciona fatores inerentes ao bezerro, com outros relacionados ao meio ambiente, a nutrição e agentes infecciosos. A enfermidade engloba efeitos de toxinas bacterianas, inflamações induzidas por parasitas ou bactérias, alteração das vilosidades intestinais determinadas pela ação viral ou de protozoários. Os principais agentes etiológicos envolvidos correspondem as bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Clostridium perfringens*), vírus (coronavírus e rotavírus bovinos) ou protozoários (*Cryptosporidium* sp. e *Eimeria* spp.), sendo que cada um destes agentes pode causar infecção isoladamente ou de forma conjunta, sendo a segunda situação a de maior ocorrência (FAGAN et al., 1995; JEREZ,1997).

Os prejuízos econômicos determinados por estes quadros clínicos são elevados, sendo que aos rotavírus pode ser atribuída maior importância, por estarem presentes em aproximadamente 60% dos casos de diarreia de bezerros neonatos (JEREZ, 1997).

Atualmente, o rotavírus conjuntamente com o coronavírus bovino, são os vírus mais importantes dentre a etiologia das diarreias neonatais em bezerros (BABIUK et al., 1985; SNODGRASS et al., 1986; ESTES, 1996).

Devido à importância do rotavírus do grupo A na etiologia das diarreias neonatais, torna-se necessário o estudo de sua variação antigênica. No que se refere aos rotavírus do grupo A, a classificação se faz pela antigenicidade de VP4, definindo o genótipo P e VP7 pelo genótipo G (ESTES; COHEN, 1989).

Os rotavírus do grupo A (RV-A) são classificados como G e P-genótipos de acordo com as proteínas do capsídeo exterior, VP7 (glicoproteína) e VP4 (protease sensível), respectivamente. A classificação do genótipo baseia-se nos resultados da transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), e análise da sequência de nucleotídeos. Com base em diferenças moleculares, pelo menos, 25

diferentes G-tipos e 33 tipos de P já foram descritos (HOSHINO; KAPIKIAN, 2000; RAO et al., 2000; MARTELLA et al., 2007; GHOSH et al., 2008; GREENBERG; ESTES, 2009; LÁSZLÓ et al., 2009; MATTHIJNSSENS et al., 2009; SCHUMANN et al., 2009; SOLBERG et al., 2009; TROJNAR et al., 2009).

A RT-PCR tornou-se método essencial no estudo dos rotavírus, não apenas para a simples detecção de presença ou ausência do vírus, mas, principalmente, para a classificação de genótipos de amostras positivas no ELISA ou PAGE, existindo diverso e complexo conjunto de variações de combinações de primers (GOUVEA et al., 1990; GREGORI, 2003; PANG et al., 2004).

Propriedade antigênicas do rotavírus (grupo, subgrupo e sorotipos) são determinadas pelas proteínas do capsídeo. A especificidade do grupo é determinado pela proteína viral VP-6, a mais abundante proteína viral que classifica os rotavírus em sete grandes grupos (A-G) (BARREIRO et al., 2004).

Três proteínas são utilizadas para a caracterização do rotavírus: VP6, a proteína do capsídeo interno, caracteriza rotavírus em grupo e subgrupo; VP7 e VP4, presentes no capsídeo externo, caracterizam G e P genótipos, e estão envolvidas na neutralização do rotavírus (BRITO et al., 2000).

BoRV-A são classificados como genótipos G6, G8 ou G10, associados com qualquer P-[1], P-[5] e - ou P-[11], e combinações de genótipos G6P-[5], G6P-[1] e G10P-[11], são considerados as mais comuns. No entanto, os genótipos G1, G3, G5, G7, G11, G15 e P-[7], P-[14], P-[17] e P-[21] também têm sido descritos para as amostras BoRV-A, mas com menor frequência (HUSSEIN, 1993; FUKAI et al., 1999; RAO et al., 2000; GHOSH et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi avaliar amostras de fezes de bezerros assintomáticos provenientes de rebanhos de corte de diversas propriedades ou regiões do Estado de Mato Grosso, quanto à presença do RV grupo A.

Material e Métodos

Amostras fecais

Sessenta e oito amostras de fezes não diarreicas foram obtidas de bezerros provenientes de cinco diferentes propriedades de pecuária de corte de cinco municípios do Estado de Mato Grosso (Pontes e Lacerda, Diamantino, Cáceres, Nobres e Tangará da Serra). Os animais avaliados eram de ambos os sexos e apresentavam idade inferior a 30 dias. As amostras fecais foram armazenadas a -20°C até a realização das análises laboratoriais.

Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)

Inicialmente, a detecção e caracterização eletroforética do conjunto genômico do BoRV-A, nos extratos de fezes, foram obtidos por meio da técnica de EGPA, seguida pela coloração utilizando prata (LAEMMLI, 1970; PEREIRA et al., 1983). Somente as amostras positivas na técnica de EGPA foram submetidas à genotipagem.

Extração de ácidos nucleicos

A extração de ácidos nucleicos, a partir das amostras de fezes, foi realizada utilizando-se a

combinação dos métodos de extração fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/isotiocianato de guanidina, conforme protocolo descrito por Alfieri et al. (2006). O ácido nucleico extraído foi mantido a -20°C até a realização da RT-PCR.

RT-PCR

Os genes VP7 (genótipo G) e VP4 (genótipo P) foram amplificados pela técnica de RT-PCR, empregando os primers consensuais anteriormente descritos, os quais geram produtos com 1.062 e 876 pb de extensão, respectivamente (GOUVEA et al., 1990; GENTSH et al., 1992).

Eletroforese em Gel de Agarose

Os fragmentos obtidos na RT-PCR foram separados e analisados por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Depois da corrida em tampão TBE, os géis foram corados com brometo de etídeo e as bandas visualizadas sob luz UV.

Sequenciamento Direto

Inicialmente, os produtos da RT-PCR foram purificados por meio da utilização do kit *illustra GFX PCR DNA and gel band purification* (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Posteriormente, o sequenciamento direto foi realizado utilizando o kit *BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), com os mesmos primers, de polaridades positiva e negativa, utilizados na RT-PCR, em um sequenciador *3500 genetic analyser* (Applied Biosystems), de acordo com as instruções recomendadas. As sequências obtidas foram examinadas quanto à qualidade dos cromatogramas gerados com o aplicativo Phred. Apenas sequências com qualidade de base igual ou maior que 20 foram aceitas. As sequências consensuais foram determinadas pelo programa CAP3 e as identidades das mesmas foram comparadas com todas as sequências depositadas no GenBank, por meio do programa BLASTn.

Resultados

Por meio da técnica de triagem EGPA, com coloração de prata, somente três bezerros, dos 68 que tiveram amostras fecais submetidas a essa técnica, apresentaram o genoma do BoRV-A identificado nas fezes através do perfil eletroforético característico dos segmentos genômicos de RNA fita dupla deste grupo de rotavírus.

Na técnica de RT-PCR, realizada com primers consensuais capazes de amplificar os genes VP7 e VP4, correspondendo aos genótipos G e P, respectivamente, apenas uma amostra dentre as classificadas como positivas no EGPA, teve ambos os genes amplificados pelos primers consensuais. As outras duas amostras positivas no EGPA tiveram apenas o gene VP7, correspondente ao genótipo G, amplificado.

Após a purificação dos produtos da RT-PCR obtidos para estas três amostras, os mesmos foram submetidos ao sequenciamento direto. A partir da obtenção das sequências consensuais destes fragmentos amplificados, e da comparação realizada no BLASTn, foi verificado que as três amostras que tiveram o gene VP7 amplificado pertenciam ao genótipo G6, enquanto a única amostra que teve o gene VP4 amplificado

pertencia ao genótipo P11. Portanto, a única amostra que teve a combinação binária de genótipos completamente definida, G6P[11], foi semelhante à cepa viral de referência KN4.

Contudo, entre os 68 bezerros de corte, com idade até 30 dias, que tiveram amostras fecais avaliadas quanto a presença do BoRV-A por meio da EGPA, e confirmadas por meio da RT-PCR e sequenciamento direto dos produtos obtidos, três bezerros (4,4%), apresentavam-se infectados pelos genótipos G6P[11] ou G6P[?] do BoRV-A.

Discussão

Atualmente, baseando-se em dados levantados por inúmeros estudos epidemiológicos com o objetivo de genotipar os RVA nos tipos G e P sabe-se que se tem 25 diferentes possibilidades de G-tipo e outras 33 de P-tipo já descritas ao redor de todo o mundo (HOSHINO; KAPIKIAN, 2000; RAO et al., 2000; MARTELLA et al., 2007; GHOSH et al., 2008; GREENBERG; ESTES, 2009; LÁSZLÓ et al., 2009; MATTHIJNSSENS et al., 2009; SCHUMANN et al., 2009; SOLBERG et al., 2009; TROJNAR et al., 2009; COLLINS et al., 2010; ESONA et al., 2010).

Quando nos referimos às variações moleculares dos genótipos G e P de BoRV-A, dados têm demonstrado que os diferentes isolados tem sido classificados principalmente como G6, G8 e G10, associados com P[1], P[5] e P[11], tendo-se como combinações mais comuns os genótipos G6P[1], G6P[5] e G10P[11] (SNODGRASS et al., 1990; FUKAI et al., 1999; GHOSH et al., 2008).

Diferentemente dos achados encontrados por outros pesquisadores, nenhuma infecção mista envolvendo mais de um G ou P tipo pôde ser identificada em nossas amostras positivas (BRITO et al., 2000; ALFIERI et al., 2004; CARUZO et al., 2010). Contudo, genótipos tipicamente descritos em outras espécies animais ou no ser humano também não foram detectados nos bezerros avaliados.

Em relação à caracterização molecular dos genes VP7 e VP4 das cepas virais de RVA identificadas em nosso trabalho, o genótipo que foi completamente definido, G6P[11], também foi detectado em amostras diarreicas de bezerros a partir de rebanhos de outros estados brasileiros. Em estudo realizado em uma bacia leiteira do estado de Goiás, o G6P[11] esteve entre as combinações de G e P tipos mais observados (CARUZO et al., 2010). De maneira semelhante, outro estudo revelou essa combinação como a mais frequentemente detectada em amostras diarreicas de rebanhos dos Estados de São Paulo (33,3%) e Minas Gerais (25%). No mesmo trabalho, a combinação de G e P tipo mais prevalente entre amostras colhidas nos estado de Goiás e Mato Grosso do Sul, foi G6P[5], identificada em 22,2% e 25% das amostras avaliadas, respectivamente. Investigações conduzidas em outros países, como na Argentina e na Irlanda, também detectaram a circulação do genótipo G6P11 em seus rebanhos, porém em baixas frequências (GARAICOECHEA et al., 2006; REIDY et al., 2006; CARUZO et al., 2010; SILVA et al., 2012). Diferentemente, esse foi o genótipo mais prevalente entre os identificados em estudo no norte da Itália (MONINI et al., 2008).

Curiosamente, Barreiro et al. (2004) relataram ser essa a combinação binária mais prevalente entre os RVA caracterizados a partir de bezerros com diarreia, oriundos de vacas de corte e leite vacinadas contra o BoRV-A. Nestas fêmeas foi utilizada vacina comercial inativada, produzida com o vírus de referência NCDV (G6P[1]).

Semelhantemente, a demonstração do G6 como o G tipo mais prevalente também foi realizada em estudos conduzidos nos estados de Goiás (64,5% e 41,9% das amostras estudadas), São Paulo (33,3% e 61,1%), Mato Grosso do Sul (50%) (BRITO et al., 1998; BUZINARO et al., 2009; SILVA et al., 2012). Adicionalmente, este G tipo também foi o mais detectado em 66% das amostras diarreicas estudadas e provenientes de 8 rebanhos de corte e leite de estados das regiões Centro-Oeste (Goiás e Mato Grosso do Sul), Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná) (ALFIERI et al., 2004). Em investigação conduzida no norte da Itália, o genótipo G6 também foi identificado na maioria das amostras diarreicas avaliadas (78,5%) por RT-PCR (MONINI et al., 2008).

A dificuldade em amplificar o gene VP4 e, portanto, de se definir o genótipo P, para duas de nossas amostras positivas no PAGE também foi documentada em outras investigações (FUKAI et al., 2002; BARREIROS et al., 2004; CARUZO et al., 2010; SILVA et al., 2012). Essas falhas têm sido atribuídas a diferentes fatores, tais como presença de substâncias inibidoras da RT-PCR no ácido nucleico extraído a partir das amostras fecais e presença de genótipos diferentes daqueles que os primers utilizados são capazes de anelar (GOUVEA et al., 1990; WINIARCZYK; GRADZKI, 2002).

Quanto ao genótipo P caracterizado a partir de nossas amostras, P[11], o mesmo também foi anteriormente observado, na forma de infecção única ou em infecções mistas com outros P tipos, em amostras diarreicas de bezerros de rebanhos de outros estados brasileiros. Em São Paulo, esse foi o genótipo P mais encontrado, sendo demonstrado em 66,7%, nos casos de investigados de diarreia (CARUZO et al., 2010; SILVA et al., 2012). Resultados similares foram obtidos em investigação de um surto de diarreia neonatal realizada no estado de Goiás, onde 35,5% das amostras fecais apresentavam cepas caracterizadas com o genótipo P11 (BRITO et al., 2000). O predomínio do genótipo P11 também foi verificado nos dados levantados em um estudo conduzido no norte da Itália (MONINI et al., 2008).

A importância do nosso trabalho se deve à confirmação, por meio de métodos moleculares, da circulação do BoRV-A entre bezerros assintomáticos de rebanhos do Estado de Mato Grosso. O baixo percentual de amostras positivas para o BoRV-A (4,4%) demonstrado em nosso estudo se deve ao fato da análise ter envolvido apenas bezerros sem sinal clínico de diarreia neonatal bovina. Porém tem-se que, provavelmente, este percentual seria maior se a avaliação envolvesse casos dessa enfermidade. Adicionalmente, o conhecimento dos genótipos circulantes no campo representa informação importante para que medidas profiláticas vigentes sejam reavaliadas e vacinas eficientes sejam elaboradas.

Segundo o conhecimento dos autores deste estudo, esta investigação representa a primeira com o objetivo de caracterizar molecularmente os genes VP7 e VP4 de cepas de RVA obtidas a partir de bezerros do Estado de Mato Grosso. Diante da grande importância do estado no âmbito nacional da produção pecuária, principalmente na exploração de carne, mas também na leiteira, a condução de trabalhos visando a identificação de agentes etiológicos, sabidamente envolvidos com a diarreia neonatal bovina, que estão circulando nos rebanhos mato-grossenses, assim como a elucidação de aspectos moleculares dos mesmos, torna-se imprescindível para se assegurar a alta produtividade destes sistemas e evitar perdas econômicas significativas.

Sabendo-se que os genótipos que são selecionados para as vacinas inativadas atualmente utilizadas

no Brasil, para controlar as infecções por BoRV-A, são selecionados a partir dos tipos como mais prevalentes nas localidades produtoras das vacinas (USA e Argentina), torna-se crucial o levantamento epidemiológico dos genótipos circulantes nas diversas regiões do país. Somente deste modo, será possível produzir respostas vacinais mais efetivas empregando-se cepas molecularmente semelhantes às aquelas identificadas a campo ou incluindo os genótipos mais prevalentes em vacinas polivalentes. Dados demonstrados no estudo de Barreiros et al. (2004), onde a combinação de genótipos G6P[11] foi tida como a mais prevalente entre vários rebanhos bovinos vacinados com a combinação binária de BoRV-A G6P[1], frequentemente utilizada em vacinas inativadas comercializadas no Brasil, evidenciaram a ausência de prevenção na circulação do G6P[11] nestes rebanhos. Diante desse fato, poderia ser levantada a dúvida de que tais vacinas poderiam ser eficientemente utilizadas para gerar resposta imune passiva protetora nos rebanhos infectados por G6P[11] do Estado de Mato Grosso.

Referências

- ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian title herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*, v. 38, p. 521-526, 2006.
- ALFIERI, A. F.; ALFIERI A. A.; BARREIROS, M. A. B.; LEITE, J. P. G.; RICHTZENHAIN, L. J. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Veterinary Microbiology*, v. 99, p. 167-173, 2004.
- BABIUK, L. A.; SABARA, M.; HUDSON, G. R. Rotavirus and coronavirus infections in animals. *Progress in Veterinary Microbiology and immunology*, v. 1, p. 80-120, 1985.
- BARREIRO, M. A. B.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; LEITE, J. P. G.; ALFIERI, A. A. G and P genotypes of grup A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the ncdv (P[1],G6) rotavirus strain. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 51, p. 104-109, 2004.
- BEARDS, G. M.; DESSELBERGER, V.; FLEWETT, T. H. Temporal and geographical distributions of human rotavirus serotypes, 1983-1988. *Journal Clinical Microbiology*, n. 27, p. 2827-2833, 1989.
- BRITO, W. E. D.; MUNFORD, V.; VILLAÇA, A. M.; CARUZO, T. A. R.; RACZ, M. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p. 140-145, 2000.
- BRITO, W. M. E. D. *Caracterização sorológica e molecular de amostras de rotavirus bovino do Estado de Goiás*. 1998. 221 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 1998.
- BROWNING, G.; BOK, K.; JONES, L. R.; COMBESSIES, G.; ODÉON, A.; FERNADEZ, F.; PARRENO, V. A novel group A rotavirus G serotype: serological and genomic characterization of equine isolate FI23. *Journal Clinical Microbiology*, v. 29, p. 2043-2045, 1991.
- 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 8, p. 1040-1043, 2010.
- COLLINS, P. J.; MARTELLA, V.; SLEATOR, R. D.; FANNING, S.; O'SHEA, H. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland. *Archives of Virology*, v. 155, p. 1247-1259, 2010.

- ESONA, M. D.; ARMAH, G. E.; DUNCAN, S. A. Rotavirus VP4 and VP7 Genotypes Circulating in Cameroon: Identification of Unusual Types. *Journal of Infectious Diseases*, n. 202 (Suppl 1), p. 205-211, 2010. Supplement.
- ESTES, M. K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiology Reviews*, v. 53, p. 410-449, 1989.
- FAGAN, J. G.; DWYER, P. J.; QUINLAN, J. G. Factors that may affect the occurrence of enteropathogens in the feces of diarrheic calves in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, v. 48, p. 17-21, 1995.
- FUKAI, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOU, T. Molecular characterization of a novel bovine group A rotavirus. *Veterinary Microbiology*, v. 123, p. 217-224, 2007.
- FUKAI, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOU, T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. *Veterinary Microbiology*, v. 66, p. 301-311, 1999.
- GARAICOECHEA, L.; BOK, K.; JONES, L. R.; COMBESSIES, G.; ODÉON, A.; FERNADEZ, F.; PARRENO, V. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). *Veterinary Microbiology*, v. 118, p. 1-11, 2006.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, p. 1365-1373, 1992.
- GERNA, G.; JONES, L. R.; COMBESSIES, G.; ODÉON, A.; SINHA, M.; KOBAYASHI, N. Isolation in Europe of 69-M-like (serotype 8) human rotavirus strains with either subgroup I or II specificity and a long RNA electrophoretotype. *Archive Virology*, v. 112, p. 27-40, 1990.
- GHOSH, S.; SINHA, M.; KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, K.; NAIK, T. N. Molecular characterization of rare bovine group A rotavirus G15P[11] and G15P[21] strains from eastern India: identification of simian SA11-like VP6 genes in G15P[21] strains. *Virus Genes*, p. 241-249, 2008.
- GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, K.; NAIK, T. N. Identification of bovine rotavirus G types by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 5, p. 1338-1340, 1994.
- GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, K.; NAIK, T. N. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, p. 276-282, 1990.
- GREENBERG, H. B.; ESTES, M. K. Rotaviruses: From Pathogenesis to Vaccination. **Gastroenterology**. v. 136, n. 06, p. 1939-1951, Stanford, California, 2009
- HERRING, A. J.; INGLIS, S. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acids in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 16, p. 473-477, 1982.
- HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus antigens. In: RAMIG, R. F. *Rotaviruses*. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 180-227.
- HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *Journal of Health, Population and Nutrition*, n. 18, p. 5-14, 2000.
- HOUSE, J. A. Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 173, p. 1118-1124, 1978.
- HUSSEIN, H. A. Detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3, and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction – derived cDNA probes. *Journal Clinical Microbiology*, v. 31, p. 2491-2496, 1993.

- ISHIZAKI, H.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, K.; NAIK, T. N. The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. *Veterinary Microbiology*, v. 48, p. 367-72, 1996.
- JEREZ, J. A. Diarréias virais dos bezerros: rotavírus e coronavírus. *Biológico*, v. 59, n. 2, p. 33-37, 1997.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, n. 277, p. 680-685, 1970.
- LÁSZLÓ, B.; NYÚL, Z.; KISFALI, P.; DEAK, J.; KOVACS, J.; KONYA, J.; MESZNER, Z.; MOLNAR, P.; PÁTRI, L.; SCHNEIDER, F.; TOTH, A.; MELEG, H. B.; ITURRIZAGOMARA, M.; GRAY, J.; MARTELLA, V.; SZUCS, G.; BANYAI, K. First detection of P[6],G9 rotaviruses in Hungary - An imported strain from India? *Journal of Travel Medicine*, v. 16, p. 141-143, 2009.
- MARTELLA, V.; BANYA, K.; LORUSSO, E.; ARISTA, S.; LAVAZZA, A.; PEZZOTI, G.; DECARO, N.; CAVALLI, A. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. *Clin Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, p. 129-132, 2001.
- MARTELLA, V.; BANYA, K.; LORUSSO, E.; ARISTA, S.; LAVAZZA, A.; PEZZOTI, G.; DECARO, N.; CAVALLI, A.; LUCENTE, M. S.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAMERO, M.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 577-580, 2007.
- MATTHIJNSSENS, J.; MARTELLA, V.; CIARLET, M.; BANYAI, K.; RAHMAN, M.; ZELLER, M.; BEUTELS, P.; VAN, D.; RANST, M. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiology*, n. 4, p. 1303-1313, 2009.
- MONINI, M.; CAPPUCINI, F.; BATTISTA, P.; FALCONE, E.; LAVAZZA, A.; RUGGERI, F. M. Molecular characterization of bovine rotavirus strains circulating in northern Italy, 2003-2005. *Veterinary Microbiology*, v. 129, p. 384-389, 2008.
- NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotaviruses studied from the perspective of genogroup. *Microbiology immunology*, v. 37, p. 337-348, 1993.
- PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; CANDEIAS, J. A. N.; RACZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; TRABULSI, J. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, Sao Paulo and Belem, Brazil. *Journal of Hygiene and Environmental Health*, n. 90, p. 117-125, 1983.
- PONGSUWANNA, Y.; CAPPUCINI, F.; BATTISTA, P.; FALCONE, E.; LAVAZZA, A. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. *Journal Clinical Microbiology*, v. 34, p. 1050-1057, 1996.
- RAO, C. D.; GOWDA, K.; REDDY, B. S.; CAPPUCINI, F. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. *Virology*, n. 276, p. 104-113, 2000.
- REIDY, N.; LENNON, G.; FANNIN, S.; POWER, E.; O'SHEA, H. Molecular characterization and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002-2004. *Veterinary Microbiology*, v. 11, p. 242-247, 2006.
- SATO, M.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; CANDEIAS, J. A. N.; RACZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBA, Y. Y. B. Isolation of serotypes G8, P6[1] bovine rotavirus from adult cattle with diarrhea. *Journal Clinical Microbiology*, v. 35, p. 1266-1268, 1997.
- SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology*, n. 386, p. 334-343, 2009.

SILVA, F. D. F.; GREGORI, F.; GONÇALVES, A. C. S.; MARA, S. I. S.; BUZINARO, M. G. Molecular characterization of group A bovine rotavirus in southeastern and central-western Brazil, 2009-2010. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 32, n. 3, p. 237-242, 2012.

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

SNODGRASS, D. R.; TERZOLO, H. R.; SHERWOOD, D. A Etiology of diarrhea in young calves. *Veterinary Record*, v. 119, p. 31-34, 1986.

SOLBERG, O. D.; HASING, M. E.; TRUEBA, G.; EISENBERG, J. N .Characterization of novel VP7, VP4 and VP6 genotypes of a previously untypeable group A rotavirus. *Virology*, n. 385, p. 58-67, 2009.

TROJNAR, E.; OTTO, P.; JOHNE, R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. *Virology*, n. 386, p. 325-333, 2009.

WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z. Comparison of Polymerase Chain Reaction and Dot Hybridization with Enzyme-Linked Immunoassay, Virological Examination and Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Detection of Porcine Rotavirus in Faecal Specimens. *Journal of Veterinary Medicine*, v. 46, n. 9, p. 623-634, 2002.