

Mariela Alves e Silva

**Avaliação da prevalência do rotavirus bovino em rebanhos dos
assentamentos rurais de Corumbá/MS.**

Belo Horizonte

2009

Mariela Alves e Silva

Avaliação da soroprevalência do rotavirus bovino em rebanhos dos assentamentos rurais de Corumbá/MS.

Monografia apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Especialista em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli

Co-orientadora: M.Sc. Camila Pacheco Silveira Martins

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
2009

AGRADECIMENTOS

Em especial à meu pai (in memorian) e à minha querida Victória (in memorian), que mesmo na distância física e apesar da imensa saudade, estão sempre norteando e iluminando meus pensamentos.

À minha mãe, exemplo forte de luta, que sempre foi meu esteio em todos os momentos. Ao Marcelo, irmão querido, pela cumplicidade, força e carinho. Ao meu eterno amor, Gutenberg, que suportou juntamente comigo momentos muito difíceis e que me propiciou conhecer o verdadeiro amor (nos gestos, na amizade, na cumplicidade) e pra mim é exemplo de virtudes e caráter.

À professora Edel, por me creditar confiança (pela oportunidade) e me impulsionar a lugares nunca antes sonhados por mim. Pelo desprendimento, dedicação, carinho e conforto. Por provocar em mim a vontade de crescimento profissional e pessoal, enfim por tudo.

À Camila, a qual não tenho como mensurar minha gratidão, por tudo que me ensinou, me confortou e pelos momentos de grande, grande crescimento que passamos juntas.

À Ludmila, pela paciência de me ensinar os protocolos desde os mais simples passos e pelo tempo dedicado ao meu projeto. À Andréia pelo sorriso sempre, pela calma e pela ajuda na confecção do trabalho.

À todos do laboratório que me auxiliaram com boa vontade e me ensinaram durante este tempo o quanto um colega pode ser importante.

As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas, mas o seu eco é infindável (Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

A presença de rotavírus foi pesquisada em amostras fecais provenientes de bezerros de 5 dias até o sexto mês de vida, com e sem diarreia. Estes animais se encontravam na região de Corumbá (MS) e estavam distribuídos entre três assentamentos rurais da região – Tamarineiro, Taquaral e Paiolzinho, sendo as coletas realizadas no ano de 2007. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença do rotavírus nestes assentamentos e correlacioná-la com a ocorrência ou não de diarreia. Oitenta e três amostras fecais foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Destas amostras nenhuma apresentou positividade para o vírus estudado. Este estudo mostrou que não há prevalência nos 03 assentamentos estudados, com a metodologia utilizada, embora este agente seja descrito em outros rebanhos do Estado do Mato Grosso. A técnica aqui abordada é mundialmente utilizada com sucesso tendo grande sensibilidade na detecção do rotavírus, uma vez que durante a excreção viral, as fezes do animal ou humano infectado podem conter até 1000 partículas / grama de fezes.

ABSTRACT

Rotavirus was assayed in fecal samples of calves with and without diarrhea collected during 2007. These animals were located at Corumbá (MS, Brazil) e were distributed into three settlements named Tamarineiro, Taquaral and Paiolzinho . This work has the objective of verify the occurrence of Rotavirus and to find correlation with diarrhea. Eighty three samples were test using Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). All of samples tested were negative to Rotavirus. Overall, this study have shown no prevalence of rotavirus in the geographical region studied, using PAGE methodology and for the 03 settlements evaluated, although Rotavirus is reported in the Mato Grosso State. PAGE is used around the world with success, having great sensitivity, once that during the virus excretion, feces of infected animal and human can have around 1000 particles by gram, and the test is proved to be suitable for rotavirus detection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática da partícula viral do rotavirus	15
Figura 2 - Estrutura esquemática do Rotavirus, evidenciando os 11 segmentos genômicos com as respectivas proteínas codificadas e a estrutura protéica da partícula viral	17
Figura 3 – Representação esquemática do padrão de migração, em Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, do RNAdf relativo aos eletroferogrupos A, B, C, D e E de Rotavirus	19
Figura 4 - Esquema simplificado das principais etapas de replicação intracelular dos rotavirus.....	24
Figura 5 – Corte histológico das vilosidades intestinais, A – intestino normal; B – intestino infectado por rotavirus.....	26
Figura 6: Administração de solução hidroeletrólítica em bezerro com diarreia	31
Figura 7 - Partículas de rotavirus visualizadas em microscópio eletrônico	32
Figura 8: Distribuição espacial do rebanho de bovinos, com destaque para os dez principais municípios Brasil.....	37
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) – gel corado pela prata.1. Rotavirus padrão bovino – amostra ATCC VR 542 – amostra Lincoln; 2 e 3 – amostras clínicas testadas – negativas. S de 1-11 = segmento gênico	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bd - bidestilada

DNA - ácido desoxiribonucleico

dNTP - deoxinucleotídeo trifosfatado

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EIARA - Ensaio imunoenzimático para rotavirus e adenovírus

ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay

et al.= e colaboradores

gp - glicoproteína

mM - milimolar

N-PCR – *Nested* PCR

NSP - proteína não estrutural (*Non-Structural Protein*)

ORF - Região aberta de leitura (*Open Reading Frame*)

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

pb - pares de base (*base pairs*)

PBS - tampão salina - fosfato

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

pmol - picomol

pH - potencial hidrogeniônico

q.s.p. – quantidade suficiente para

RNA - ácido ribonucleico

RNAfd - ácido ribonucleico fita dupla

RT - Transcrição Reversa (*Reverse Transcription*)

RV gp A - rotavirus grupo A

VP - proteína viral (*Viral Protein*)

SDS - dodecil sulfato de sódio

TBE - tampão Tris-Borato-EDTA

TERV – tampão de estabilização de rotavirus

TRIS - hidroximetil aminometano

μL = microlitro (10^{-6} litro)

μM - Micromolar (10^{-6} Molar)

μg – Micrograma (10^{-6} grama)

% = por cento

$^{\circ}\text{C}$ = graus Celsius

et al. = e colaboradores

Kg = quilograma

M = molar

mg = miligrama

mL = mililitro

p/v = peso/volume

v/v = volume/volume

® = marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2	HISTÓRICO	12
3	CARACTERÍSTICAS DOS ROTAVIRUS	14
3.1	Estrutura morfológica	14
3.2	Estrutura genômica	17
3.3	Classificação	19
3.4	Sorotipos	20
3.5	Ciclo de replicação viral	21
3.6	Quadro clínico da gastroenterite bovina.....	23
3.7	Forma de transmissão	26
3.8	Resposta Imune do hospedeiro	27
3.9	Tratamento	28
3.10	Diagnóstico da infecção pelo rotavirus bovino	30
3.10.1	Microscopia eletrônica	30
3.10.2	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	31
3.10.3	Ensaio Imunoenzimático	32
3.10.4	Aglutinação com partículas de látex	33
3.11	Profilaxia	33
3.12	Vacinas	34
3.13	Assentamentos rurais no Município de Corumbá.....	36

4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVO GERAL.....	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
5	MATERIAL E MÉTODOS	38
5.1	Amostras fecais bovinas.....	38
5.2	Extração de RNA.....	38
5.3	Caracterização das amostras (PAGE).....	39
5.4	Coloração do RNA pela prata.....	40
5.5	Interpretação dos resultados	40
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
7	CONCLUSÃO	43
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As gastroenterites em bovinos apresentam distribuição mundial e acarretam prejuízos à pecuária pela mortalidade, morbidade, custos com tratamentos, profilaxia e aumento da suscetibilidade a outras infecções (PAUL AND LYOO, 1993; KANEENE, HURD, 1990). A diarréia é um complexo de etiologia multifatorial relacionado à infecção, fatores nutricionais, ambientais e a prática de manejo. Estudos apontam que esta entidade clínica pode ser desencadeada por bactérias, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* sp; vírus, rotavirus, coronavírus; protozoário *Cryptosporidium* sp; toxinas; fatores ambientais/manejo como, qualidade da nutrição, baixa temperatura, pobre higienização, privação do colostro e suscetibilidade do animal (SNODGRASS et al., 1986; TAKIUCHI et al., 2006).

Em relação aos agentes virais, o rotavirus apresenta maior incidência em mamíferos nos casos de adoecimento entérico no mundo (BARREIROS et al., 2003; TAMEHIRO et al., 2003). No Brasil, já foi detectado em muitas propriedades de criação de bovinos e suínos (SAN JUAN et al., 1986; BITTENCOURT e RÁCZ, 1992; BRITO, 1998). De modo geral, a rotavirose bovina é prevalente em animais jovens (idade inferior a três semanas), porém a doença pode ocorrer em todas as faixas etárias, incluindo bovinos adultos (LUCHELLI et al., 1992).

Os agentes correlacionados com o quadro de gastroenterite, sendo que cada agente ou a combinação de diferentes, podem ser responsáveis por grandes surtos, além de caracterizar-se como zoonose, em alguns casos (SNODGRASS et al., 1986; TAKIUCHI et al., 2006). Assim, para o controle das gastroenterites é essencial o diagnóstico inserido num contexto epidemiológico. O diagnóstico da rotavirose fundamenta-se na detecção do vírus no material fecal. Atualmente, há diferentes técnicas disponíveis para a identificação viral, sendo que nesta

infecção, rotineiramente, são utilizadas a imunomicroscopia eletrônica, caracterização em gel de poliacrilamida e ELISA, pois apresentam alta especificidade (LINHARES et al, 2005). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a soroprevalência do rotavirus em amostras fecais de bovinos nos assentamentos rurais Tamarineiro, Taquaral e Paiolzinho situados no município de Corumbá, MS.

2 HISTÓRICO

O Rotavirus bovino (RVB) foi associado a quadros diarréicos pela demonstração experimental. Mebus e colaboradores (1969) inocularam em bezerros saudáveis, filtrado de material fecal de animais com diarreia, sendo reproduzido o quadro diarréico nesses animais, além da identificação pela microscopia eletrônica das partículas virais. Essas partículas foram denominadas *Nebraska Calf Diarrhea Virus* (NCDV) Posteriormente, diferentes autores isolaram esses vírus, sendo considerado um importante agente causador de diarreia (WHITE et al., 1970).

Na década de 70 foi demonstrada a semelhança entre as partículas virais do rotavirus com as dos Reovirus, logo sendo então denominado *Neonatal Calf Diarrhea Reovirus-like* (NCDRL) (FERNELIUS et al., 1972). Em seguida, Woode, Jones e Bridger (1975) relataram a presença de rotavirus em fezes diarréicas de leitões. Desde então, inúmeros trabalhos têm sido publicados relacionando os RV a gastroenterites em diversas espécies de mamíferos e de aves.

O RVB foi detectado no gado brasileiro por pesquisadores em bezerros que variam de 1 a 120 dias de idade em diferentes propriedades rurais (BRITO,1994; BUZINARO et AL,2000; JEREZ et AL,1987.) com prevalência que variam de 53%, 28,12% e 22% (Reinhardt et al,1991, Shah, Jhala ,1992).

Na espécie humana os rotavirus foram descritos pela primeira vez em 1973, na Austrália, por Bishop e colaboradores (1973), pela identificação de partículas virais em cortes histológicos de mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda, por meio de microscopia eletrônica. No ano seguinte, vírus com características semelhantes foram detectados em amostras fecais de crianças com gastroenterite aguda (BISHOP et al., 1974).

No Brasil, a primeira descrição de RV em humanos ocorreu em 1976, a partir de material fecal proveniente de crianças admitidas em um hospital público de Belém, PA (LINHARES et al., 1977). Desde então, foram realizadas inúmeras investigações em crianças no país, demonstrando a ocorrência de surtos de diarreia associados ao RV (RACZ et al., 1988; PEREIRA et al., 1993; MASCARENHAS et al., 1999). Inicialmente, esses vírus foram denominados orbivirus e reovirus-*like*, por apresentarem semelhança morfológica aos membros da família *Reoviridae* (FLEWETT; BRYDEN; DAVIES, 1973).

No ano de 1974, Flewett e colaboradores evidenciaram a semelhança das partículas virais presentes nas fezes de crianças com gastroenterites agudas e de bezerros com quadro de diarreia, as mesmas eram morfológicamente indistinguíveis à microscopia eletrônica. Ademais, fundamentados na identidade antigênica da partícula viral em ensaios de imunofluorescência e imunomicroscopia eletrônica e a semelhança morfológica desses vírus a uma roda (em latim "rota") foi proposta a denominação rotavirus para agrupá-los. Em seguida, no ano de 1978, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) propôs a formação do Gênero *Rotavirus*, dentro da Família *Reoviridae* (MATTHEWS, 1979).

3. CARACTERÍSTICAS DOS ROTAVIRUS

3.1 Estrutura morfológica

Os rotavírus pertencem à família Reoviridae e ao gênero *Rotavirus*. A partícula viral completa apresenta morfologia esférica, com diâmetro de 75nm, capsídeo icosaédrico com 3 camadas protéicas concêntricas: capsídeo externo, intermediário e interno e não são envelopados (ESTES, 1996; PRASAD; CHIU, 1994). No interior do capsídeo encontra-se o genoma constituído por ácido ribonucléico de fita dupla (RNAfd), com 11 segmentos (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996), sendo que cada segmento regula a síntese de uma proteína viral. Esses genes codificam polipeptídeos estruturais e não-estruturais (DESSELBERGER, 1989). Estudos com a linhagem símia SA11 de RV, identificaram uma sexta proteína não-estrutural, codificada pelo segmento 11 do genoma viral, sendo esse o único segmento de RV que codificaria mais de uma proteína (MATTION et al., 1991) (Figura 1).

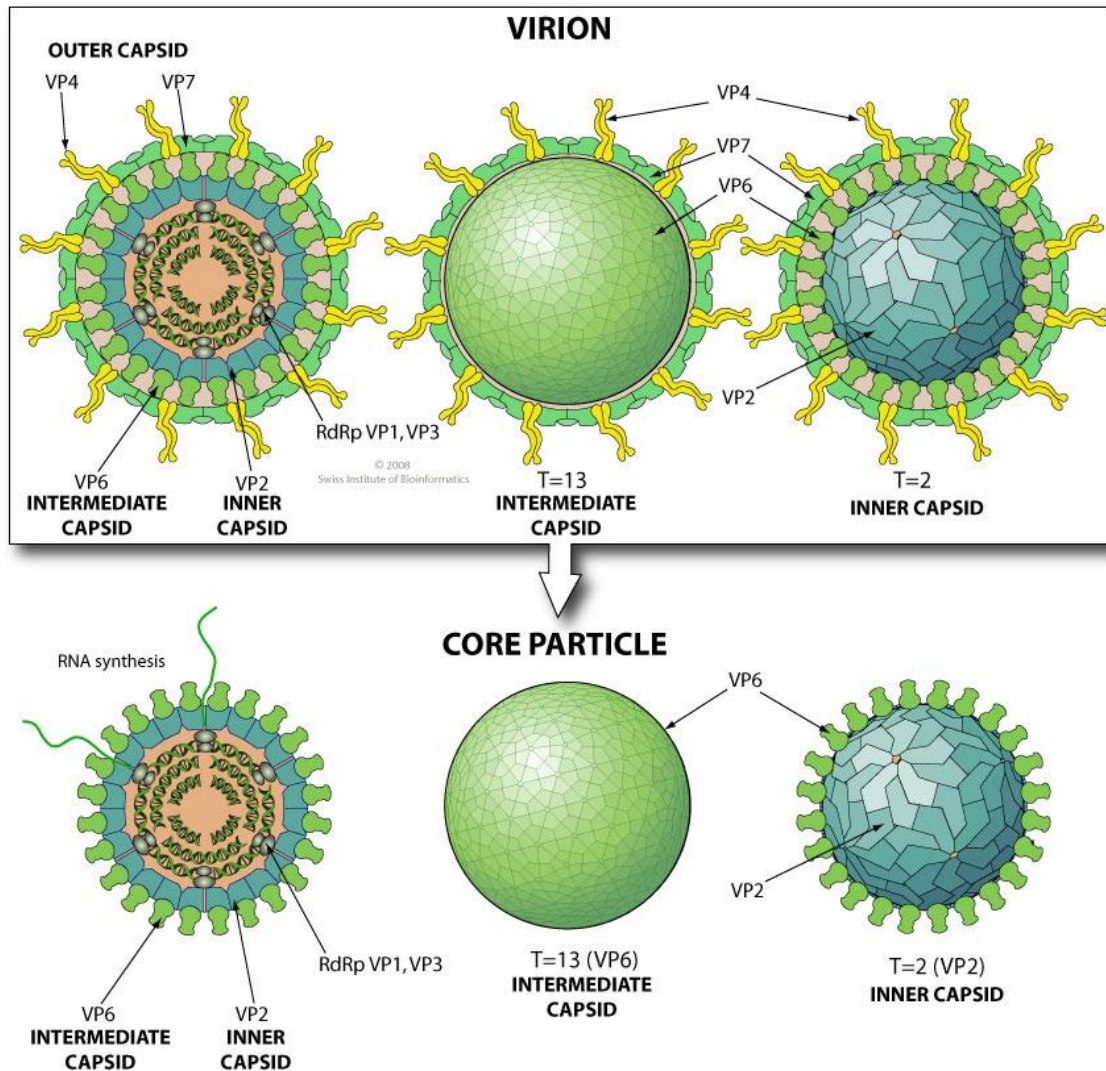


Figura 1 – Representação esquemática da partícula viral do rotavírus. *Fonte:* http://education.expasy.org/images/Rotavirus_maturation.jpg.

As proteínas estruturais são designadas *Viral Protein* (VP) seguidas por número sequencial na ordem decrescente da massa molecular. No core estão presentes as proteínas VP1 (125KDa), VP2 (94KDa) e VP3 (88KDa), codificadas pelos segmentos de RNA 1, 2 e 3, respectivamente. O capsídeo intermediário é formado pela proteína VP6 (41KDa) codificada pelo segmento 6, por sua vez a camada externa é produzida a partir dos segmentos gênicos 4 e 9 que codificam as proteínas VP4 (88KDa) e VP7 (37KDa), respectivamente (ESTES; COHEN, 1989; ESTES, 2001) (Figura 2).

As proteínas não-estruturais, encontradas nas partículas virais maduras, recebem a denominação *Non-Structural Protein* (NSP) e são transcritas a partir dos segmentos 5, 7, 8 10 e 11, designadas NSP1 a NPS6 (ESTES; COHEN, 1989) (Figura 2).

No cerne viral, as proteínas VP1 (Pol) e VP3 (Cap) estão diretamente associadas ao genoma, sendo que a proteína VP1 atua como RNA polimerase RNA-dependente e a proteína VP3 possui atividade de guanililtransferase, estando envolvida na adição da estrutura 5'-cap presente nos RNAs mensageiros. A proteína VP2 constitui a estrutura do capsídeo interno, sendo a mais abundante do core viral com 120 moléculas por vírion. A camada intermediária do capsídeo é composta inteiramente pela proteína estrutural VP6, totalizando 780 proteínas organizadas em 260 unidades triméricas, a qual circunda o cerne e onde se encontram os epítomos grupo-específicos (A-G), comuns a diversas espécies animais propensas à infecção (ESTES, 2001; GREENBERG et al., 1983). As proteínas VP7 e VP4 formam a camada externa do vírion, sendo responsáveis pelas interações iniciais do vírus com a célula hospedeira, além de serem base para o sistema de classificação binária definido pela presença de glicoproteínas (Tipo G) e pela sensibilidade a protease (Tipo P), respectivamente. A glicoproteína VP7 forma a matriz do capsídeo externo e estar associada com a produção de anticorpos neutralizantes, incluindo aqueles sorotipo-específicos. A VP4, estruturalmente, possui projeções que se projetam da matriz protéica e desempenham importante papel no mecanismo da penetração viral na célula, e está associada aos genótipos P (Estes, 2001).

As proteínas não-estruturais, estão envolvidas na replicação (NSP1-NSP3, NPS5 e NSP6) e na morfogêneses (NSP4), e com exceção da NSP4, todas interagem com o ácido ribonucléico (ESTES & KAPIKIAN, 2007). A proteína NSP4, especialmente, funciona como receptor intracelular para as partículas virais imaturas e são consideradas como enterotoxinas, induzindo diarreia no hospedeiro (MORI et al., 2002).

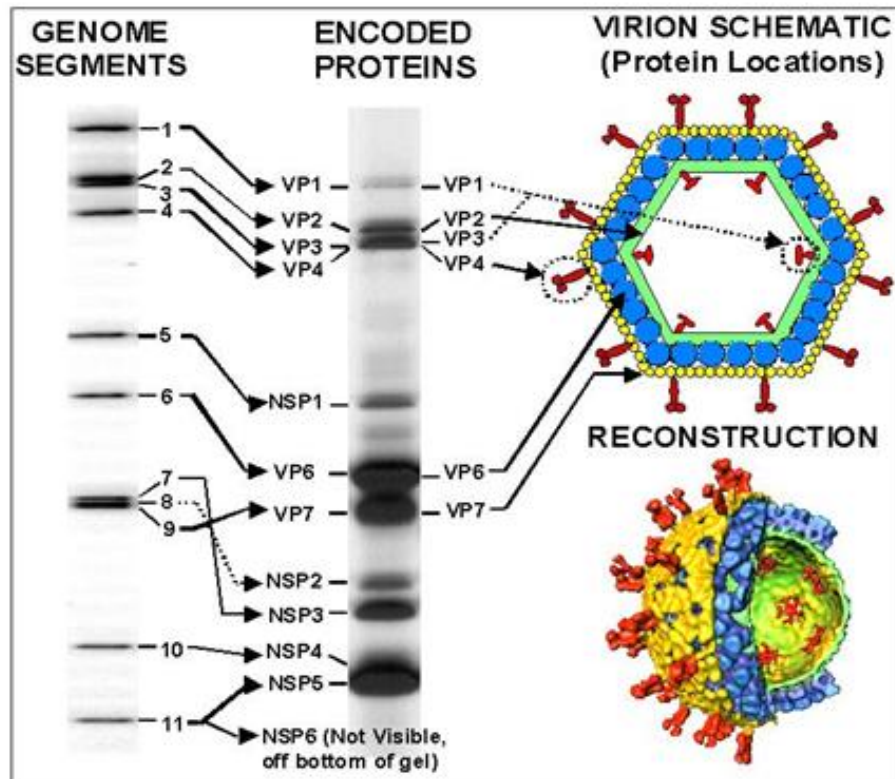


Figura 2 - Estrutura esquemática do Rotavirus, evidenciando os 11 segmentos genômicos com as respectivas proteínas codificadas e a estrutura protéica da partícula viral. Fonte: *Peter et al, 2000*.

3.2 Estrutura genômica

A estrutura genômica dos rotavirus é formada por 11 segmentos de dsRNA inseridos no capsídeo viral, sendo esta organização gênica única entre os vírus que infectam aves e mamíferos. O genoma completo desses vírus apresenta aproximadamente 18.600 pb. Cada gene, por sua vez, é constituído por segmentos que variam de 600 a 3000 pb (ESTES, 2001).

Devido ao fato dos rotavirus apresentarem o material genético segmentado e com tamanho molecular diferente possibilita a visualização dos 11 segmentos quando submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, apresentando um perfil de migração característicos e único para os rotavirus. Os segmentos são distribuídos em quatro classes as quais são numerados pela ordem de migração no gel: classe I (segmentos 1, 2, 3 e 4), II (5 e 6), III (7, 8 e 9) e IV (10 e 11); ou 4:2:3:2. A velocidade de migração dos segmentos “10” e “11” determina o perfil longo (migração rápida) ou curto (lenta), havendo, ainda, o padrão “super curto” (Estes, 2001; Kapikian et al., 2001). Ocasionalmente os RVs pertencentes ao grupo A exibem a configuração do perfil aviário, com a típica distribuição 5:1:3:2. Os integrantes dos grupos B e D denotam padrão 4:2:2:3, e o C, por sua vez, 4:3:2:2 (figura 3).

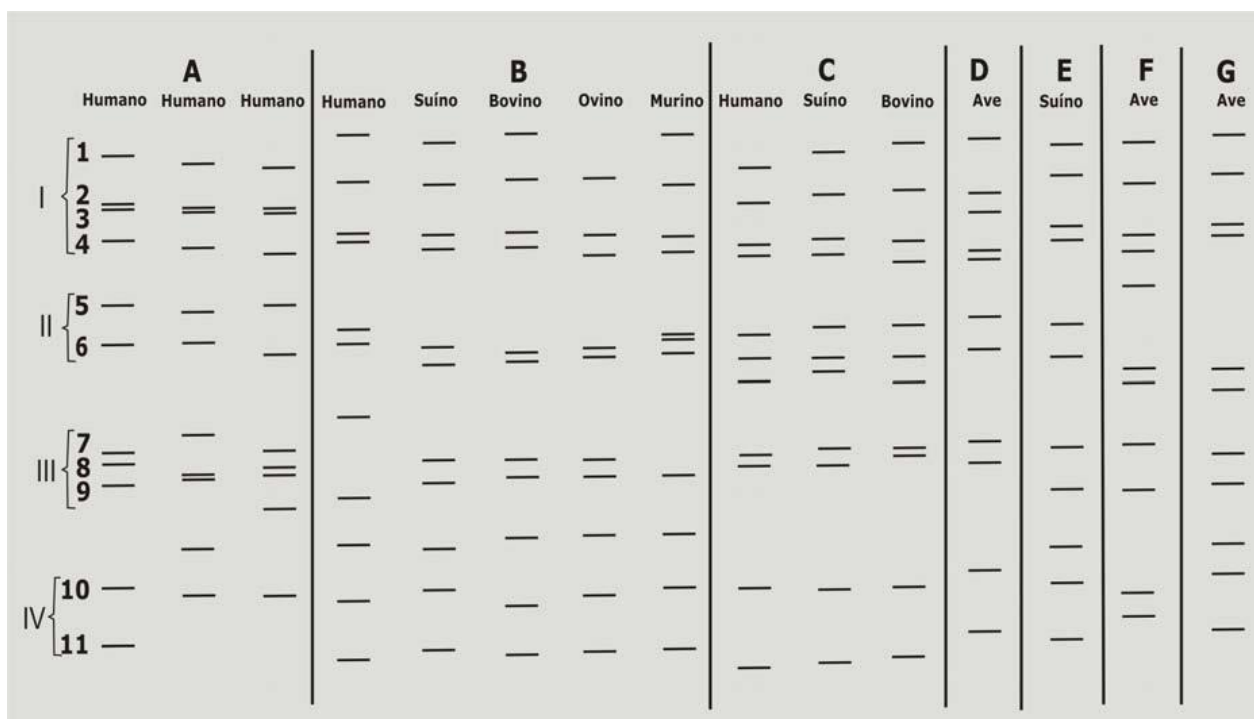


Figura 3 – Representação esquemática do padrão de migração, em Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, do RNA_{df} relativo aos eletroferogrupos A, B, C, D e E de Rotavirus. *Fonte: Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).*

Em relação às moléculas de dsRNA, essas não possuem caráter infeccioso, pelo fato das partículas virais apresentarem suas próprias RNA polimerases (RNA-dependente viral) para codificar os segmentos individuais de RNA em RNA mensageiros (mRNA). A transcrição é realizada de maneira assimétrica, sendo que cada segmento de RNA possui polaridade positiva, sendo sintetizado a partir da fita negativa do RNA genômico (ESTES, 2001). A extremidade 5' das fitas de RNA possuem uma estrutura *cap*, semelhante à encontrada no mRNA celular, entretanto não apresentam a extremidade 3' poliadeniladas. Todos os genes são flanqueados por regiões traduzidas de extensão variável junto as extremidades 5' e 3', sendo que essas apresentam seqüências comuns conservadas, denominadas consensuais. A maioria dos mRNA terminam com uma seqüência de consenso 5' -UGUGACC-3', contendo importantes seqüências sinalizadoras que desencadeiam a expressão dos genes (Estes, 2001).

3.3 CLASSIFICAÇÃO

O rotavírus apresenta três importantes especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipo, sendo estas diretamente relacionadas à presença de proteínas no capsídeo viral. Este critério permite a classificação de múltiplos grupos ou sorogrupos e a existência de múltiplos sorotipos dentro de cada grupo (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996). Atualmente, foram caracterizados sete sorogrupos (A-G), que apresentam um antígeno comum e um padrão distinto de migração eletroforética dos 11 segmentos do RNAfd (KAPIKIAN; HOSHINO; CHANOCK, 2001), estando associados à infecção no homem, outros mamíferos e mesmo entre aves (figura 3).

Os grupos A, B e C, estão associados à gastroenterite humana, mas podem infectar animais, já os pertencentes aos grupos D, E, F e G estão relacionados com a gastroenterite em mamíferos e aves. Dos sete sorogrupos dos RV somente os grupos (gp) A, B e C determinam infecções, que, por sua freqüência, podem ser consideradas de importância epidemiológica para humanos e animais (SAIF,

1990). O RV grupo A é o principal causador de diarreia infantil grave nos humanos e em muitas espécies animais, sendo encontrado mundialmente, e estando relacionado com mais de 500 mil mortes anuais de crianças menores de cinco anos (PARASCHAR et al., 2003). Esse grupo contém como antígeno comum, a VP6, detectado pela maioria das técnicas sorológicas rotineiramente utilizadas como recurso diagnóstico (Kapikian et al., 2001). Adicionalmente, o RV grupos B, C e G compreendem, em sua maioria, amostras que infectam animais, com a proteína VP6 diferente daquela comum aos RVs integrantes do grupo A. Tais amostras não são detectadas por técnicas sorológicas convencionais, sendo sua identificação em geral efetuada por imunomicroscopia eletrônica, eletroforese do dsRNA em gel de poliacrilamida (PAGE) e metodologias moleculares (Kapikian et al., 2001). Estudos epidemiológicos demonstram que, a rotavirose causada pelo grupo A de RV é mais frequentemente relatada, seguida por infecções pelo grupo C, tanto no homem quanto em animais (SAIF, 1990).

3.4 Sorotipos

Os sorotipos ou genótipos do rotavírus podem ser caracterizados pela capacidade de indução de anticorpos neutralizantes e de segregação durante o processo de replicação; através das proteínas do capsídeo externo VP4 e VP7 e também segmentos genômicos que codificam tais proteínas (KAPIKIAN; CHANOCK, 1990). Através da análise da sequência de nucleotídeos do gene correspondente à glicoproteína VP7 e por meio de técnicas sorológicas, são descritos atualmente 14 sorotipos e 15 genótipos G de rotavírus do grupo A, denominados assim de G1 a G15 (HOSHINO; KAPIKIAN, 2000).

A determinação de sorotipos P não é bem definida, existindo 11 sorotipos tentativamente designados, sendo que, quatro deles possuem subtipos, mas não possuem correlação com os genótipos P (KAPIKIAN; 14 HOSHINO; CHANOCK, 2001). O seqüenciamento de nucleotídeos do gene que codifica a proteína VP4 define 21 genótipos P de rotavírus humanos e animais, determinados de P (1) a P

(21). Logo, a identificação dos sorotipos P e G de rotavirus com o uso de métodos sorológicos apresenta limitações como: 1) alta taxa de amostras não-sorotipadas nos levantamentos epidemiológicos; 2) grande número de infecções mistas ou variantes antigênicas; 3) não caracterização de sorotipos P por meio de ensaios imunoenzimáticos comerciais (ALFIERI, 1999).

Os genótipos P e G podem se combinar de diversas maneiras possíveis, sendo que algumas combinações aparecem com maior frequência de acordo com a espécie hospedeira aparentando predomínio na frequência destas associações. Pesquisas mostram que quatro combinações P-G, P[8],G1, P[4],G2, P[8],G3 e P[8],G4 são amplamente distribuídas mundialmente, em frequências variáveis, além dos genótipos emergentes P[8],G9 e P[6],G9 (SANTOS; HOSHINO, 2005).

As técnicas usadas com maior eficácia para a caracterização dos rotavirus são as técnicas moleculares como a hibridização de ácidos nucleicos, a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) e com maior destaque a genotipagem. Esta última passou a ser usada como técnica de maior eficiência, pois possui boa relação com a especificidade antigênica e garante a análise de um maior número de amostras em menor tempo (GENTSCH et al., 1996).

3.5 CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

O rotavirus penetra o organismo pela via fecal-oral, assim, após a ingestão as partículas virais entram em contato com a mucosa intestinal. O vírus apresenta tropismo pelas células do intestino delgado, infectando os enterócitos maduros da região apical das vilosidades intestinais. Diferentes estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem a presença de um ou mais receptores específicos nessas células. Logo, a infectividade pode estar associada com a presença de moléculas de ácido siálico (AS) na superfície celular. Entretanto, já foi descrito que algumas linhagens são independentes de AS, ou seja, resistentes a neuraminidase. Dessa forma,

vem sendo proposta a existência de dois receptores para o rotavírus, AS-dependentes (gangliosídeos) e os AS-independentes (integrinas). Em relação às linhagens que infectam animais e humanos a maioria é identificada como AS-independente. (ALFIERI ET AL,2007)

A adsorção viral é promovida pela proteína VP4 ou pelo seu produto de clivagem, a proteína VP5. Além dessas proteínas, autores apontam a participação da proteína VP7 nesse processo, sendo os resultados ainda incipientes. Provavelmente, o vírus penetra na célula de maneira direta pela membrana plasmática, após a clivagem da proteína VP4 e exposição do peptídeo de fusão VP5 ou pelo processo de endocitose. O processamento da partícula via mecanismos endocíticos ocorre pela ação de enzimas lisossomais presentes nas vesículas endocíticas, sendo esse processo dependente de cálcio (ALFIERI ET AL,2007).

Após essa etapa inicia-se o ciclo de multiplicação no citoplasma dos enterócitos resultando na lise celular, saída das partículas virais completas, ou seja, com as três camadas de proteína e conseqüentemente descamação tecidual (ALFIERI ET AL,2007).

Os dsRNAs são pareados do início ao fim e a fita de polaridade positiva contém uma seqüência 5' cap m7GpppG(m)gpY (IMAI et al., 1983). Os RVs replicam e “empacotam” coordenadamente os 11 segmentos do RNA viral e os 11 mRNA compartilham sinais que são comuns, em virtude de todos eles replicarem a partir da mesma polimerase. Além disso, cada RNAm “sinaliza” que é único, em razão dos 11 mRNA serem diferenciados uns dos outros durante o processo de “empacotamento”. As regiões terminais conservadas nos segmentos do genoma contêm seqüências específicas importantes que desencadeiam o processo para o início da transcrição, tradução do RNA, transporte do RNA, replicação, montagem, conformação do capsídeo e “empacotamento” dos segmentos no genoma viral (PATTON & SPENCER, 2000).

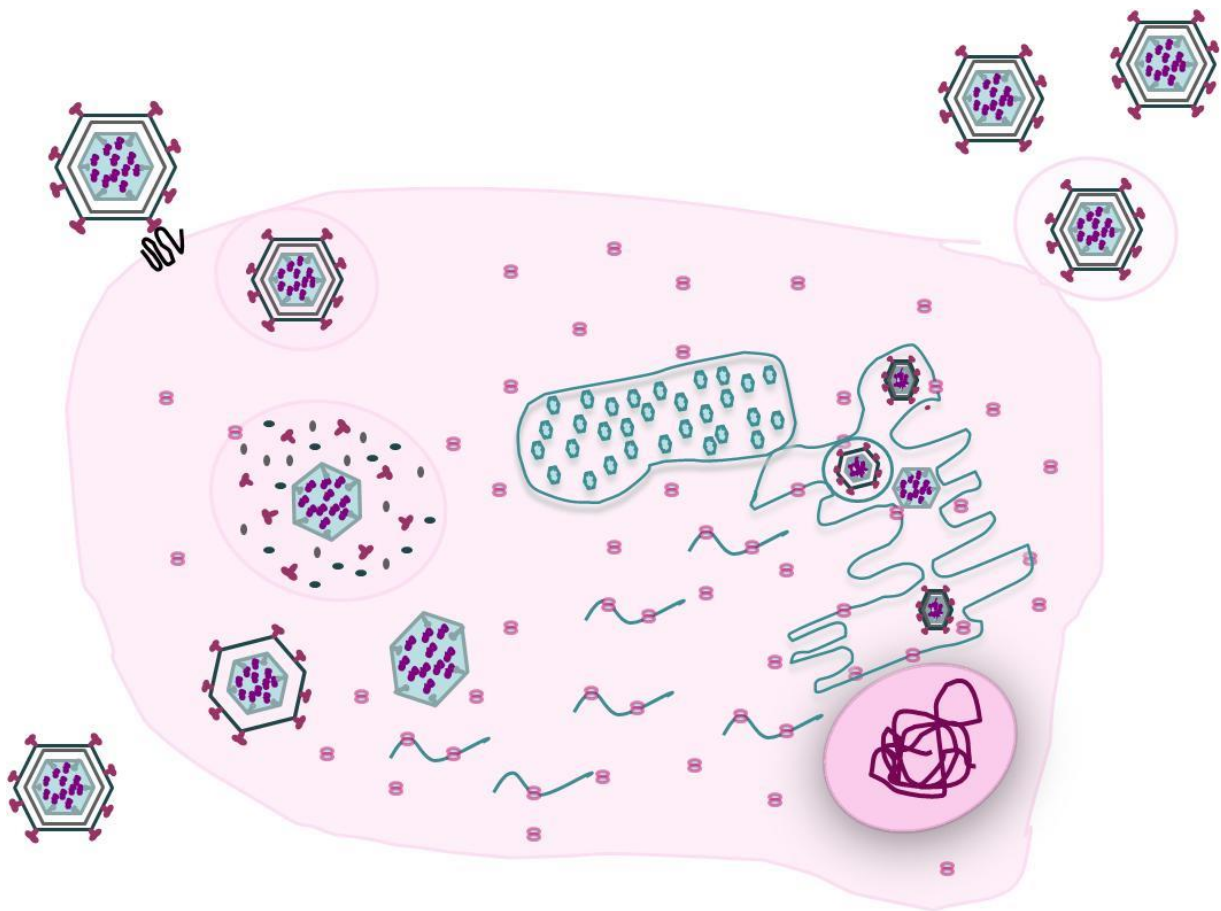


Figura 4 - Esquema simplificado das principais etapas de replicação intracelular dos rotavírus.
 Fonte: Adaptado de Linhares et al ,2005.

3.6 QUADRO CLÍNICO DA GASTROENTERITE BOVINA

A gastroenterite é uma doença diarréica conhecida pelo seu rápido início, e com sintomas que podem ou não incluir náuseas, vômitos, febre ou dor abdominal. (American Academy of Pediatrics -96/97). A etiologia das diarréias é bastante complexa e pode estar associada a diferentes agentes etiológicos como: vírus, bactérias, parasitas e toxinas, sendo que a distribuição sazonal dos agentes etiológicos está intimamente relacionada com as condições higiênica/sanitária de cada região (BERN, GLASS, 1994; CICIRELLO, GLASS, 1994), condições

ambientais, manejo, fatores nutricionais e fisiológicos, o que provoca agravamento do quadro geral do animal diarréico (SNODGRASS et al.,1986).

Em bovinos, a gastroenterite é associada a diversos patógenos, principalmente rotavirus, coronavírus; *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Salmonella* sp e o protozoário *Cryptosporidium* sp (SNODGRASS et al.,1986). De forma geral a rotavirose bovina acomete com maior freqüência animais jovens (idade inferior a três semanas), porém a síndrome pode ocorrer em todas as idades incluindo bovinos adultos (LUCCHELLI et al., 1992).

Rotavirus são apontados como um dos principais agentes etiológicos de diarréia em bezerros com idade inferior a três semanas, resultando em grandes perdas econômicas à pecuária de leite e corte (Tzipori, 1981; Snodgrass et al., 1986; Lucchelli et al., 1992).

Em animais neonatos a diarréia é resultado da multiplicidade de agentes etiológicos e por isso deve ser analisada como síndrome (CHARLES, FURLONG, 1992), sendo considerada uma das principais causas de mortalidade neste período (SCHUDEL et al., 1985).

O período mais crítico para a ocorrência das rotaviroses é o primeiro mês de vida, devido à reposição lenta do epitélio apical das vilosidades tornando assim mais fácil o desenvolvimento completo do ciclo replicativo. Entretanto os animais adultos apresentam resistência à doença, pois a reposição de seus enterócitos é mais rápida e compete com a replicação do vírus, sendo que somente amostras muito virulentas podem provocar quadro diarréico em bezerros com idade superior à seis semanas. O quadro clínico de rotavirose também não é freqüente em animais com até uma semana de vida, provavelmente devido à ingestão de colostro contendo anticorpos maternos seguida da neutralização do vírus por tais anticorpos (ALFIERI ET AL,2007) – (Figura 5).

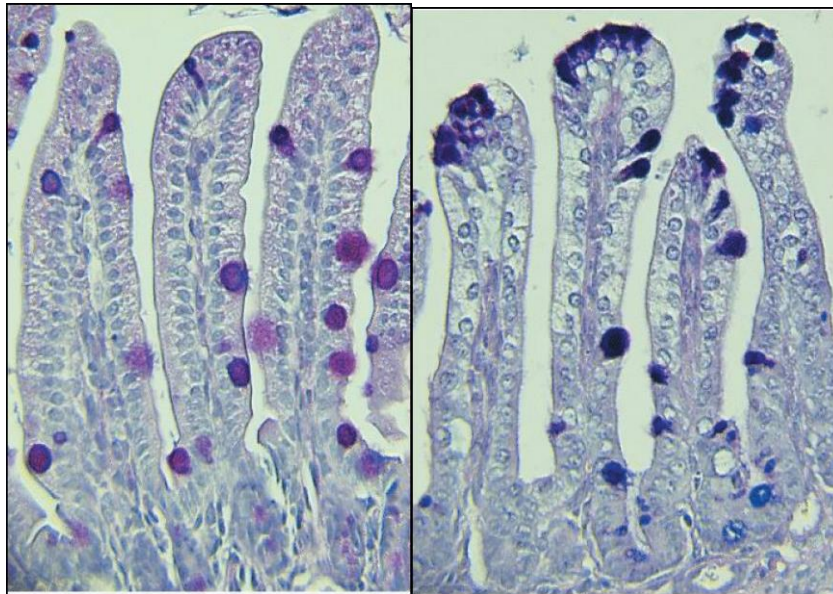


Figura 5 – Corte histológico das vilosidades intestinais, A – intestino normal; B – intestino infectado por rotavirus .

Fonte:

http://www.msda.com.ar/msdar/hcp/especialidades/pediatria/_common/hcp/diseases/rotavirus/rotavirus_02.html

Dentre os agentes virais, o gênero *Rotavirus* é considerado o maior gênero presente na etiologia das gastroenterites infecciosas em crianças e animais neonatos (ESTES, 1996), com ampla distribuição geográfica mundial (ACHA, SZYFRES, 1986).

O quadro clínico, apresentado por bovinos infectados por rotavirus, pode incluir: diarreia, prostração, anorexia, febre e desidratação. O período de incubação da doença varia de 18 a 96 horas (MEBUS, 1990) sendo que a morte dos animais pode ocorrer de acordo com o grau de desidratação e o quadro diarréico do animal (MEBUS, 1990) em um período de 3 a 7 dias após o início da diarreia (COLUCHI; KROEFF; 2000).

Em crianças, a rotavirose é precedida por um período de incubação que pode variar de 24 a 48 horas. (WARD et al.,1986) e caracteriza-se pelo aumento do número de evacuações, com fezes aquosas ou de pouca consistência por cinco a oito dias, acompanhada de vômito, febre por dois ou três dias e dor abdominal, desidratação (LINHARES, BRESEE, 2000).

3.7 FORMAS DE TRANSMISSÃO

A principal via de transmissão desta virose é fecal-oral, sendo desta forma de difícil controle, pois está intimamente relacionada a fatores como saneamento básico, nutrição, e suporte médico-hospitalar (KAPIKIAN et al 2001).

Em ambientes com pouco ou nenhum saneamento básico, os dejetos humanos e de animais, vazamento de esgotos; e enchentes se tornam poluidores e contaminantes da água utilizada pela população local e para a manutenção dos animais. Esta mesma água pode ser usada na agricultura, causando assim contaminação de alimentos; na irrigação de pastos, na lavagem das instalações e na nutrição dos animais. Desta forma, poderá provocar surtos de rotavirose, assim sendo a água contaminada com o vírus um meio eficaz de propagação da doença. (KAPIKIAN et al 2001, ESTES 2001).

Alguns fatores contribuem para a ampla disseminação do vírus, como por exemplo: as altas taxas de excreção viral; o período de excreção; a existência de portadores e a alta resistência dos vírions no ambiente. A Rotavirose pode ser considerada uma zoonose e ao mesmo tempo uma antropozoonose, uma vez que há ocorrências de sorotipos tipicamente de animais que infectam humanos e vice-versa. A diversidade de rotavirus circulantes encontrada em países tropicais em desenvolvimento se deve ao fato de ocorrer uma transmissão natural entre espécies distintas dos mesmos (GOUVEA E SANTOS,1997).

3.8 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

Os estudos que se referem a resposta imune do hospedeiro após a infecção pelo rotavírus ainda são incipientes e não esclarecem de forma completa os mecanismos imunológicos envolvidos (ALFIERI et AL, 2007).

A imunidade humoral mediada por imunoglobulinas da classe A (IgA secretora) aparenta ser a principal defesa orgânica contra a infecção sintomática pelo rotavírus. Estudos realizados na Austrália e nos Estados Unidos associaram níveis detectáveis de IgA fecal contra rotavírus à sensível redução na taxa de infecções sintomáticas causadas por esses enteropatógenos (COULSON et al. 1992, MATSON et al. 1993).

A formação de anticorpos neutralizantes, principalmente IgG, é induzida através das proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7), intermediário (VP6) e da proteína não estrutural NSP4. Segundo estudos, o papel destas imunoglobulinas ainda não foi elucidado. Em experimentos realizados com cordeiros neonatos gnotobióticos, os determinantes primários da resistência à infecção pelo rotavírus foi hipotetizada a participação de anticorpos presentes na luz intestinal, já os anticorpos circulantes não apresentaram função de resistência. (ALFIERI et AL, 2007)

Observou-se também a proteção de animais neonatos contra a rotavirose através do mecanismo de ação das IgGs neutralizantes de origem materna, através do processo de neutralização viral via fenômeno de transcitose, antes que o processo infeccioso se estabeleça no enterócito (WARD, 1996).

Na imunização passiva de bezerros a imunoglobulina IgG é considerada a mais importante (Menanteau-Horta et al., 1985) desta forma associa-se proteção contra diarreia e presença de alta quantidade de IgG1 (Saif et al., 1983; Fernandez et al., 1998), uma vez que nesta espécie animal a IgG1 possui papel importante na imunidade de mucosa intestinal. Em estudo de infecção experimental por rotavírus

em bezerros, os que apresentavam alto níveis séricos de IgG1 apresentavam quadro mais brando e período mais curto de diarreia (Parreño et al., 2004). Observou-se aumento nos títulos de IgA e IgM em animais com níveis baixos de IgG1 , após desafio com rotavirus (Fernandez et al., 1998; Parreño et al., 2004) .

A imunidade celular na infecção pelo rotavirus tem sido amplamente estudada em camundongos (modelos experimentais) sendo observadas as seguintes características:

- 1- anticorpos específicos são de importância primária na proteção contra recidiva.
- 2- amostras homólogas de rotavirus desempenham resposta humoral muito mais potentes do que amostras heterólogas.
- 3- Os linfócitos T CD8+ têm papel importante na resolução da infecção e de forma menos efetiva observa-se a participação também de linfócitos CD4+.
- 4- As citocinas e células *Natural Killer* (NK) também participam da eliminação do vírus.

Em suma, a imunidade celular está fortemente relacionada à melhora do quadro clínico e fracamente relacionada com a recidiva da infecção (ALFIERI et AL ,2007).

3.9 TRATAMENTO

O tratamento é apenas sintomático, desta forma, o animal deve ser colocado em ambiente ventilado, aquecido, sendo importante a fluidoterapia e antibioticoterapia contra infecções secundárias (<http://www.saudeanimal.com.br/artig131.htm>)

O objetivo primário no tratamento da gastroenterite é a reposição dos fluídos e eletrólitos, cuja acentuada perda se processa via episódios de vômitos e diarreia. Aliás, compreende-se que na quase totalidade das situações de diarreia, independente da etiologia, a reidratação, representa tratamento básico, mesmo na vigência de vômitos (BLACKLOW & GREENBERG, 1991, BEZERRA et al, 1992).

A solução hidroeletrólítica administrada de forma lenta, em geral, minimiza a frequência dos vômitos, tendendo corrigir satisfatoriamente o desequilíbrio de fluidos e eletrólitos no curso das primeiras 4 horas de tratamento (BASS, 2003).

Alguns antivirais possuem a propriedade de inibir a replicação dos rotavirus, destacando-se: ribavirina, isoflavinas e análogos da adenosina (DE et al, 1984, KITAOKA et al. 1986). As investigações envolvendo o uso desses produtos em animais, oferecem resultados inexpressivos em termos de eficácia, daí a ampla reserva que ainda prevalece quanto à sua utilização em seres humanos (STEINHOFF 1980, SMEE 1982, KITAOKA et al., 1986). Estudos sobre a atividade antiviral dos interferons (tipo 1 e 2) alcançaram resultados satisfatórios em bovinos (SCHWERS et al., 1985); no entanto, para o tratamento de camundongos diarréicos caracterizou-se como ineficaz (Angel et al. 1999). Alguns pesquisadores sustentam que o uso de corticosteróides em murinos e bovinos com diarréia causada pelos rotavirus minimiza a sintomatologia (WOLF et al., 1981, RHOADS et al., 1988).



Figura 6: Administração de solução hidroeletrólítica em bezerro com diarreia. *Fonte: homepage.usask.ca/~Ashley/rotavirus.html*

3.10 DIAGNÓSTICO DE ROTAVIROSE

O diagnóstico das infecções por Rotavirus é baseado na identificação de partículas, antígenos ou RNA viral em amostras fecais. As técnicas mais utilizadas são a imunomicroscopia eletrônica, eletroforese em gel de poliacrilamida e ELISA (LINHARES et AL ,2005)

3.10.1 Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica consiste na visualização das partículas virais encontradas nas fezes. O material a ser examinado deve ser corado com

fosfotungstato de potássio ou outro corante usado para tal fim. A partícula viral pode ser observada sob um aumento de 30.000 a 50.000 vezes. O diagnóstico é positivo em 80% a 90% das amostras contendo rotavirus, uma vez que a morfologia da partícula viral é característica e a excreção do vírion, para sua viabilidade no ambiente, é aproximadamente de 100.000 partículas por mililitro de fezes. Esta técnica necessita de equipamento sofisticado e, portanto, apresenta alto custo, além disso, não é recomendada para diagnóstico em larga escala. Geralmente esta técnica é utilizada para dirimir dúvidas referentes a outro diagnóstico realizado (ALFIERI et AL ,2007 ; LINHARES et AL 2005).

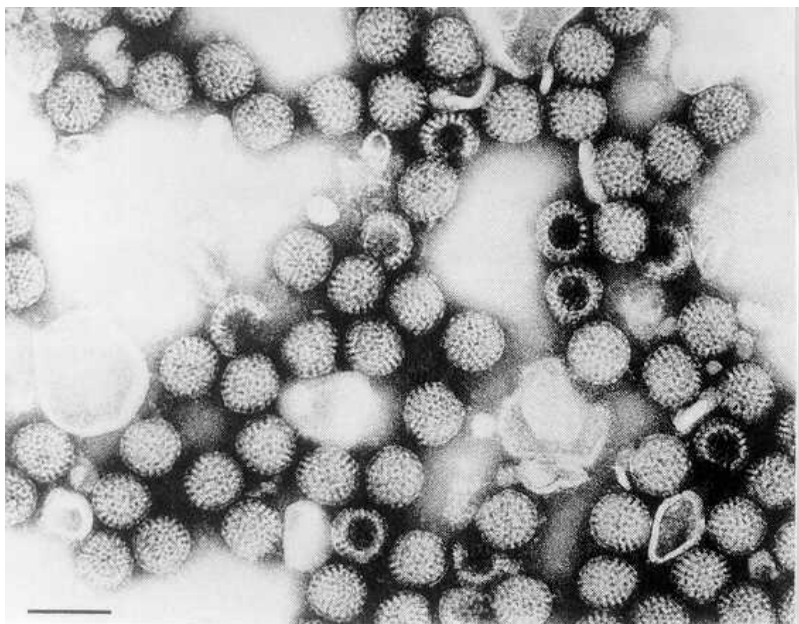


Figura 7 - Partículas de rotavírus visualizadas em microscópio eletrônico. (Kapikian AZ, HW Kim, RG Wyatt et al: Reovirus-como agente nas fezes: associação com diarreia infantil e desenvolvimento de testes sorológicos. Ciência 15:1049, 1974)

3.10.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Esta técnica consiste na visualização do RNA viral, que possui 11 fragmentos, em um gel de poliacrilamida após sua corrida eletroforética. O processo se inicia com a retirada da parte protéica da suspensão fecal através da adição de dodecil-

sulfato de sódio e fenol, posteriormente precipita-se o RNA viral pela adição de 95% de etanol. Após a ressuspensão do sedimento a eletroforese das amostras é realizada em gel de poliacrilamida, afim de observar, após a coloração do ácido nucléico pela prata, a separação nítida dos 11 segmentos de RNA viral (LINHARES et al 2005).

A técnica de PAGE é sensível e possui a vantagem da classificação das amostras virais de acordo com seus eletroferotipos. É uma técnica simples, porém há impedimentos quanto à sua utilização rotineiramente em laboratórios de pequeno porte devido à necessidade de equipamentos específicos para realização da técnica (LINHARES et al 2005).

3.10.3 Ensaio Imunoenzimático

O ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) tornou-se a técnica mais divulgada e prática na identificação do rotavirus, sendo assim muito eficaz para o diagnóstico de exames fecais em larga escala. A eficácia da técnica se deve a reagentes de alta pureza química e também reconhecida especificidade biológica. Nesta prática os anticorpos (policlonais ou monoclonais) específicos para a proteína VP6 dos rotavirus do grupo A são utilizados para a ligação com os antígenos virais presentes na amostra. Os kits imunoenzimáticos encontrados no mercado para detecção da rotavirose animal, de forma geral, possuem alta sensibilidade, são executados facilmente e com rapidez, além de apresentam baixo custo (LINHARES et al ,2005).

O kit denominado EIARA (*Enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus*) foi desenvolvido pela fundação Oswaldo Cruz e após estudos tem se mostrado muito prático e com ampla aceitação no Brasil (PEREIRA et al.1985, 1993 in: LINHARES et al ,2005).

3.10.4 Aglutinação com partículas de látex (APL)

A aglutinação com partículas de látex (APL) consiste primeiramente na sensibilização de microesferas de látex com anticorpos monoclonais para a proteína VP6 que posteriormente serão colocadas em contato com preparações fecais e assim em amostras positivas ocorrerá aglutinação quando observadas contra superfície escura (Pai et al. 1985, Brandt et al. 1987 in: Linhares ET AL , 2005). Esta técnica tem se revelado muito prática, de baixo custo (aproximadamente 3 vezes inferior ao preço do ELISA) e muito eficaz quando se refere à rapidez do resultado, aproximadamente 5 minutos. Possui sensibilidade comparável à do ELISA e devido à rapidez de seu resultado é recomendado para uso em hospitais. No mercado já estão disponíveis kits de alta qualidade (LINHARES et AL 2005).

3.11 PROFILAXIA

Além da adoção de medidas higiênico-sanitárias é importante também incluir na profilaxia medidas gerais como:

- Isolamento de animais infectados;
- Criação de animais de faixa etárias uniformes;
- Desinfecção de instalações;
- Rodízio de piquetes de parições em rebanhos bovinos de criação extensiva;
- Vazio sanitário. (ALFIERI et al,2007)

A identificação de patógenos é essencial para o controle das rotavirose, pois desta forma as medidas profiláticas serão mais direcionadas e assertivas.

3.12 VACINAS

A rotavírose bovina é responsável por grandes perdas econômicas, não somente pela alta taxa de mortalidade, mas também pelo crescimento tardio dos animais e gastos com medicamentos (LANGONI. H, 2004)..

A vacinação apresenta resultados positivos quando realizada em recém-nascidos (oral) e em fêmeas no terço final de gestação para proteção dos bezerros. Estudos evidenciam a redução da gravidade do quadro clínico, e menor perda de peso quando há uso das vacinas. Cerca de seis a duas semanas antes do parto as fêmeas devem ser vacinadas, o reforço deve ser anual e deve ocorrer preferencialmente quinze dias antes do parto (LANGONI. H, 2004).

Segundo estudos, a vacinação de vacas prenhes com vacinas de rotavírus vivo ou inativado pode elevar os títulos de anticorpos séricos antirotavírus que serão transferidos para os bezerros através do colostro e do leite protegendo-os assim passivamente (CASTRUCCI et al., 1988; TSUNEMITSU et al., 1989). Segundo estudos de campo, os resultados quanto ao nível de proteção dos bezerros, em exposição ao vírus, que tiveram mães vacinadas é variável (BELLINZONI et al., 1989; KOHARA et al., 1997). De acordo com testes, modelos murinos e bovinos que receberam por via oral imunoglobulinas obtidas da gema dos ovos de galinhas imunizadas com rotavírus tem o tempo da doença reduzido (EBINA et al. 1990, KUROKI et al. 1997).

Alguns fatores podem interferir na efetividade das vacinas contra rotavírus, são eles: passagem de anticorpos por via transplacentária, ingestão de colostro, condição nutricional, infecções mistas por rotavírus associado a outros vírus e bactérias, multiplicidade de sorotipos e subtipos capazes de produzir doença, aparecimento de novas amostras com reagrupamentos genéticos humanos ou animais, imunidade coletiva e cobertura vacinal (Kapikian 1990).

Atualmente é utilizada na vacinação de bovinos uma vacina injetável, a ScourGuard*3(K)/C® (Pfizer), que contém em sua composição culturas inativadas de Coronavírus bovino, Rotavirus bovino (amostra NCDV-Lincoln-G6P[1]), uma bacterina de *E. coli*, além de toxóide de *C. perfringens* tipo C. Segundo a bula do medicamento este objetiva a proteção dos animais contra a diarreia neonatal bovina causada por estes agentes etiológicos ou combinação deles. Esta vacina é destinada a vacas gestantes sadias que devem receber 2 doses da vacina com duas semanas de intervalo entre elas, sendo que a segunda dose deverá ser feita 15 dias antes da data prevista do parto. (SILVA,2008)

Em estudo recente, realizado com a vacina citada acima, obteve-se menor incidência de rotavirose em propriedade onde a vacinação não foi realizada do que na propriedade onde houve vacinação. Entende-se que a circulação do agente viral entre os animais seria suficiente para estabelecer uma imunidade natural contra ao rotavirus. Ainda neste estudo os bezerros nascidos de vacas imunizadas foram mais acometidos pela rotavirose, apesar de apresentarem títulos mais elevados de imunoglobulinas (SILVA,2008)

Duas vacinas foram desenvolvidas para entrar no calendário de imunização humano. A Rotarix® (GSK) que foi introduzida em 2006 no calendário de vacinação é uma vacina monovalente com rotavirus humano atenuado. Já a Rotateq®, (Merck) que teve seu licenciamento em 2006 é uma vacina pentavalente reagrupante bovino-humana. As duas vacinas foram exaustivamente testadas em mais de 60.000 crianças e não provocaram intussuscepção. A primeira dose da vacina foi administrada em crianças com menos de 3 meses e apresentam-se seguras e eficazes contra o sorotipo G1, principalmente para quadros diarreicos moderados ou graves, para outros sorotipos a eficácia da vacina foi testada insuficientemente. (Bricks,2005)

3.13 Assentamentos Rurais no município de Corumbá

A região centro –oeste, em 2004, concentrava 34,80% de todo o rebanho bovino do Brasil, seguida da Norte com 19,45%, Sudeste com 19,26%, Sul com 13,79% e Nordeste com 12,70%. Dos dez principais municípios detentores de rebanhos de bovinos no Brasil, oito estavam na Região Centro-Oeste do país: cinco deles estavam no Mato Grosso do Sul e três no Mato Grosso (IBGE ,2004) (Figura 6).

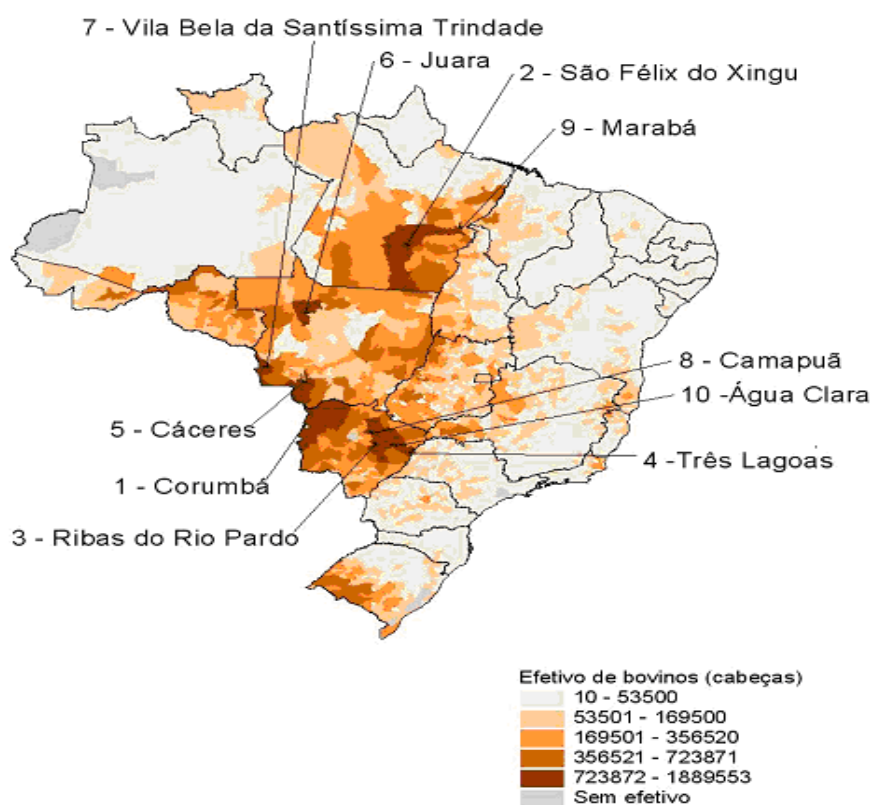


Figura 8: Distribuição espacial do rebanho de bovinos, com destaque para os dez principais municípios – Brasil. Fonte: IBGE, 2004.

A região do Mato Grosso do Sul, em especial a cidade de Corumbá, possui um número efetivo de aproximadamente 2 milhões de cabeças de gado (IBGE,2004).

O município de Corumbá localiza-se na região centro-oeste do Brasil no estado do Mato grosso do Sul. Corumbá possui 95,6% (61,8 Km²) do seu território inserido na planície pantaneira. Na cidade de Corumbá, há presença de assentamentos rurais, os quais fazem parte do projeto de reforma agrária do governo federal. Destes assentamentos, três foram estudados neste projeto para a pesquisa de rotavirus em bovinos. Os assentamentos estudados denominam-se Tamarineiro II, Taquaral e Paiolzinho. Estes assentamentos distam da cidade de Corumbá aproximadamente 17 Km. O assentamento Tamarineiro 2 encontra-se dividido em duas glebas (norte e sul). A área dos assentamentos é a seguinte: a) assentamento Paiolzinho possui 1.196,75 hectares, distribuídos em 50 lotes e possui 400 cabeças de gado; b) assentamento Tamarineiro 2 (norte e sul) possui 10.621,08 hectares distribuídos em 319 lotes e possui 1.500 cabeças de gado; c) assentamento Taquaral com 10.013,24 hectares distribuídos em 394 lotes com 4.000 cabeças de gado. (TOMICH,2007)

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a prevalência do rotavirus em amostras fecais de bezerros nos assentamentos rurais Tamarineiro, Taquaral e Paiolzinho situados no município de Corumbá, MS.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o RNA viral de amostras de fezes bovinas provenientes de 3 assentamentos rurais em Corumbá, MS.

- Caracterizar por PAGE as amostras.
- Correlacionar a presença do vírus com a sintomatologia da gastroenterite viral.
- Contribuir para o estudo da Rotavirose Bovina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras fecais bovinas

Para realização dos experimentos foram utilizadas 83 amostras fecais de bovinos, na faixa etária de 5 dias a 6 meses, sendo 21 amostras provenientes de animais com quadro clínico de diarreia e 62 amostras oriundas de bovinos sem sinais e sintomas clínicos. Essas amostras foram coletadas em 3 assentamentos rurais no município de Corumbá/MS, na região pantaneira no ano de 2007 e enviadas sob resfriamento, ao Laboratório de Microrganismos Intracelulares, Departamento de Microbiologia, UFMG/ICB/, para o diagnóstico laboratorial de rotavirose.

5.2 Extração de RNA

O RNA foi extraído do material fecal pelo método fenol/clorofórmio, segundo Herring et al. (1982), com algumas modificações introduzidas por Pereira et al (1985). Brevemente, as amostras fecais foram pesadas e preparada uma suspensão à 20% (p/v) em TERV (tampão de estabilização de rotavirus - Tris-HCl 50 mM; CaCl₂, 13 mM; pH 7,4) sendo as mesmas adicionadas de pequenas pérolas de vidro em tubos plásticos cônicos e submetidas a três ciclos de agitação em aparelho tipo vortex, para melhor emulsificação do material e liberação de eventuais partículas virais ao sobrenadante fecal. Os tubos foram então centrifugados por 10 minutos a baixa rotação (900g) e após, o sobrenadante foi cuidadosamente vertido em novo tubo e estocados a - 20°C até o momento do uso. Para a extração do RNA propriamente dita, uma alíquota de 500µL foi adicionada

microtubo cônico plástico e acrescida de 100 µL de tampão de lise (SDS 0,2% em PBS) e incubada em banho maria por 15 minutos a 55°C. Logo, acresceu-se 500 µL de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (proporção 25:24:1) e procederam-se 3 ciclos de homogeneização por rápida centrifugação, seguida de incubação a 37° C por 10 minutos. A solução foi centrifugada a 10.000g por 10 minutos, para separação da fase aquosa. Esta foi retirada com micropipeta cuidadosamente e transferida para um novo microtubo de polietileno tipo *ependorf*. Posteriormente, foi acrescentado na fase aquosa 500 µL de clorofórmio, sendo esta submetida a centrifugação a 10 000g por 5 minutos. Recolheu-se a fase superior da amostra e transferiu para um novo microtubo de polietileno tipo *ependorf*. Logo, adicionou-se 40 µL de uma solução 3M de acetato de sódio (pH 5,2) e álcool etílico resfriado a 20 °C, na proporção de 2x o volume. Finalmente, a amostra foi submetida ao resfriamento a – 20°C por 16-18 h, para a precipitação do ácido nucléico.

5.3 Caracterização das amostras (PAGE)

As amostras foram então centrifugadas por 20 minutos a 10.000g, e sobre o sedimento formado adicionou-se diretamente 50 µl de tampão de amostra (TRIS–HCL 62,5 mM pH 6,8 ; uréia 5M, β – mercaptoetanol 5% ; SDS 3% e 0,01 de Azul de Bromofenol), sendo essas incubadas por 15 minutos a 56°C. Os RNA foram separados por fracionamento eletroforético em gel de poli(acrilamida) a 7% (acrilamida/bisacrilamida na proporção 30:0,8) utilizando um sistema descontínuo de pH (LAEMMLI, 1970) em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,6, glicina 0,2 mM), por 4 hora a 100V. Em todos os géis de testagem foi utilizada uma amostra padrão de rotavirus bovino (amostra *Lincoln* – ATCC VR452). Esta amostra foi anteriormente expandida em monocamadas de células MA-104, e o sobredante (após 03 ciclos de congelamento/descongelamento após visualização

de efeito citopático) foi estocado a -20°C até o momento da extração de RNA como em 4.2..

5.4 Coloração do RNA pela prata

O processo de coloração com nitrato de prata foi realizado de acordo com Herring et al. (1982). Brevemente, o gel foi fixado por 1 hora em solução fixadora A (10% etanol e 0,5% ácido acético) e tratado por 5 minutos em solução fixadora B (10% etanol). Logo, o gel foi transferido para uma cuba com solução de prata por cinco minutos em câmara escura. Para a revelação foi utilizado uma solução a 3% NaOH e 0,5% formaldeído, sendo esse processo interrompido com solução fixadora A, após a visualização das bandas.

5.5 Interpretação dos resultados

Consideram-se positivas as amostras que apresentaram perfil eletroforético semelhante ao padrão de rotavírus bovino grupo A – amostra Lincoln.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Mato Grosso do Sul é o estado que concentra o maior número de municípios criadores de gado do Brasil, ao todo cinco municípios. Destaca-se em primeiro lugar o município de Corumbá, com aproximadamente 2 milhões de cabeças de gado (IBGE,2004). Neste município, a pecuária é desenvolvida de forma intensiva, extensiva e em assentamentos rurais, os quais adotam, principalmente, a criação de gado como meio de subsistência. Os assentamentos apresentam um quadro de grande precariedade nas instalações em geral, logo neste ambiente há maior possibilidade de disseminação de doenças, advindas também da proximidade

entre homem e animal. Desta forma, a veiculação de infecções, como a rotavirose, pode ocorrer causando grandes danos à população local e aos animais (IBGE, 2004).

A rotavirose bovina é uma doença preocupante quando relacionada à criação de gado. O quadro clínico possui rápida evolução debilitando o animal, podendo levar a morte. Desta forma, há grandes perdas econômicas que se referem a gastos com medicamentos, perda de peso do animal em crescimento, profilaxia e até mesmo perda do animal (KANEENE, HURD, 1990).

Vista a importância da entidade clínica da gastroenterite o presente estudo examinou a soroprevalência do rotavirus em bovinos de diferentes assentamentos rurais situados no município de Corumbá, MS.

Embora o rotavirus bovino tenha ampla distribuição descrita nos rebanhos brasileiros, nenhuma das 83 amostras testadas nos 03 assentamentos rurais estudados apresentou positividade, considerando-se ainda amostras provenientes de animais com ou sem diarreia.

A figura abaixo é representativa de uma série de experimentos realizados. Ressalta-se que esta técnica é de domínio do Laboratório onde foi desenvolvido este trabalho, onde já foram anteriormente desenvolvidos outros estudos com rotavirus e outros membros da família *Reoviridae*.

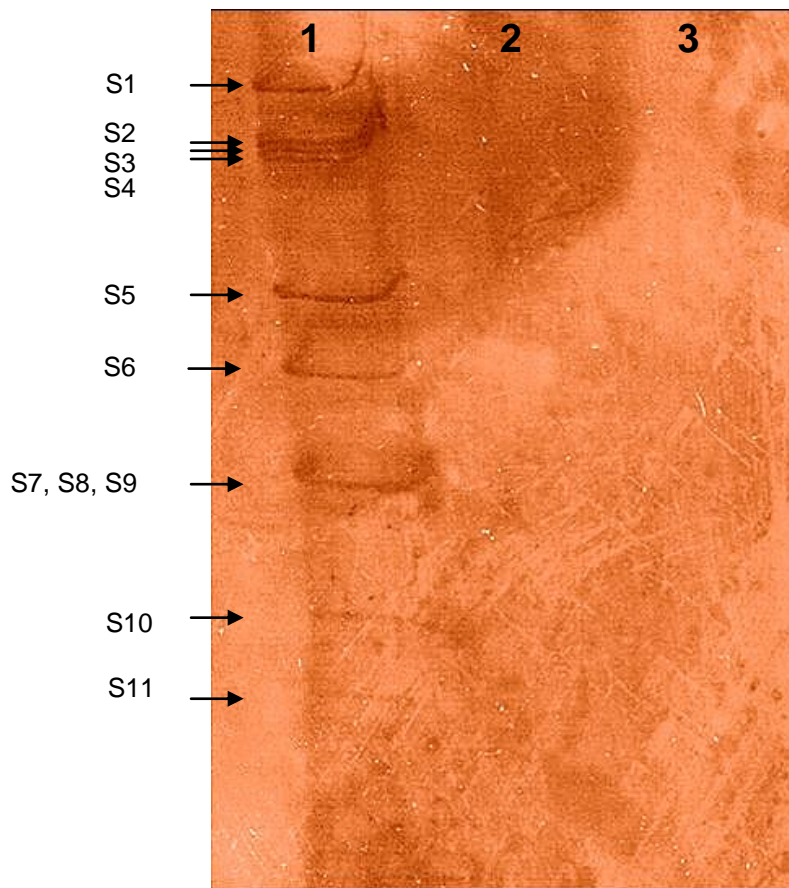


Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) – gel corado pela prata.

1. Rotavirus padrão bovino – amostra ATCC VR 542 – amostra Lincoln; 2 e 3 – amostras clínicas testadas – negativas. S de 1-11 = segmento gênico

Embora já tenha sido relatada no Mato Grosso do Sul prevalência para o rotavirus, esta é a primeira avaliação descrita para rotavirus nestes assentamentos rurais. Alfieri e colaboradores realizaram um estudo longitudinal no rebanho de quatro regiões geográficas do Brasil, sul, sudeste, centro-oeste e norte, no ano de 1998-2002. A partir da análise eletroforética em gel de poliacrilamida detectaram uma prevalência de 19,4% de rotavirus em animais com quadro clínico de diarreia e 2,2% em animais saudáveis, sendo que a maior prevalência da infecção foi detectada em animais jovens. No estado do Mato Grosso do Sul foi detectada alta prevalência da infecção pelos rotavirus, 32,7% das amostras estudadas (ALFIERI et al., 2006).

A técnica de PAGE possui grande sensibilidade, detectando pequenas quantidades de rotavírus nas amostras fecais, possui ainda a vantagem de facilitar o estudo da epidemiologia molecular, de acordo com os eletroferotipos (LINHARES et al 2005) e tendo ainda a capacidade de detectar quaisquer amostras, inclusive as do “grupo não A”. Embora tivesse sido de grande importância a testagem destas amostras por outro teste para comparação (por exemplo ELISA para rotavirus A, o que pode ser ainda realizado num futuro próximo, uma vez que as amostras encontram-se ainda adequadamente estocadas), acreditamos que análise por PAGE poderia ter detectado o agente, se alguma das amostras estudadas estivesse realmente infectada, inclusive porque dentre as 83 amostras testadas 21 eram provenientes de animais com diarreia e a faixa etária coletada abrangeu animais de 5 dias a 6 meses, com a maioria das amostras coletadas com animais da idade em que mundialmente se descreve a ocorrência do Rotavirus.

7 CONCLUSÃO

Nos assentamentos rurais do município de Corumbá, MS, estudados nenhuma amostra fecal testada foi positiva para Rotavirus, mesmo nas fezes de animais com diarreia clínica. Visto que, a prevalência desta infecção é alta no Brasil e no estado do Mato Grosso do Sul, outras técnicas deverão ser realizadas para confirmar a ausência de rotavirose bovina nestes assentamentos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHA, P.N. & SZYFRES, B. - Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2. ed. Washington, OPS/OMS, 1986. p. 763-774 (Publicación científica 503).

ALFIERI, A. A. et al. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. *Journal of Virological Methods*, v.83, n.1-2, p.35-43, 1999.

ALFIERI, A. A ; LOBATO, Z. I. P . Reoviridae. In: Eduardo Furtado Flores. (Org.). *Virologia Veterinária*. Santa Maria - RS: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2007, v. , p. 1-888.

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. *Tropical Animal Health and Production*, v. 38, p. 521-526, 2006.

American Academy of Pediatrics. Practice Parameter: The Management of Acute Gastroenteritis in Young Children. *Pediatrics*, Mar 1996; 97: 424 - 435.

Angel J, Franco MA, Greenberg HB, Bass D 1999. Lack of a role for type I and type 11 interferons in the resolution of rotavirus- induced diarrhea and infection in mice. *J Interferon Cytokine Res* 19: 655- 659.

BABIUK, L.A.; SABARA, M.; HUDSON, G.R. Rotavirus and coronavirus infections in animals. *Progr Vet. Microbiol Immunol.*, v. 1, p. 80-120, 1985.

Barreiros, M.A.B., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Médici, K.C., Leite, J.P.G., 2003. An outbreak of diarrhea in one-week-old piglets caused by group A Rotavirus Genotypes P[7], G3 and P[7], G5. *Vet. Res. Comm.* 27, 505–512.

BASS, D 2003. Treatment of viral gastroenteritis. In Desselberger U, Gray J (eds), *Viral Gastroenteritis. Perspectives in Medical Virology*, 9, Elsevier Science, Amsterdam, p. 93-104.

BERN, C.; GLASS, R. I. Impact of diarrheal diseases worldwide. In: KAPIKIAN, A. Z. (Ed.). *Viral Infections of the Gastrointestinal Trac.*, 2nd ed., New York: Marcel Dekker, 1994. p.1-26.

BEZERRA, J.A., STATHOS TH, DUNCAN B, GAINES JA, UDALL JR JN 1992. Treatment of infants with acute diarrhea: what's recommended and what's practiced. *Pediatrics* 90: 1-4.

Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *The Lancet* 2: 1281- 1283.

Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H., and Ruck, B. J. (1974). Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, 1, 149-151.

Bittencourt, M.J.; Rácz, M.L. Electrophoretic study of the genome of porcine rotaviruses from São Paulo, Brazil. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 23: 149-151, 1992.

Blacklow, N. R.;H. B. Greenberg. 1991. Viral gastroenteritis. *N. Engl.J. Med.* 325:252–264.

BRICKS,L.F. Rotavirus: atualização sobre doenças e vacinas /. *Pediatria (São Paulo)*;27(4):252-266, 2005.

BRITO, W. M. E. D. Bovine *Rotavirus* in the State of Goiás. *Revista de Microbiologia*, v. 25, p. 229-234, 1994.

Brito, W.M.E.D., 1998. Caracterização sorológica e molecular de amostras de rotavírus bovino do Estado de Goiás. Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil, 211 pp.

BUZINARO, M. G. & JEREZ J.A. Caracterização eletroforética de rotavirus em rebanhos leiteiros na região Nordeste do Estado de São Paulo. *Ars Vet.*, v. 14, n. 2, p. 193-200,1998.

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

CARDOSO, D. D.; MARTINS, R. M.; KITAJIMA, E. W.; BARBOSA, A. J.; CAMAROTA, S. C. & AZEVEDO, M. S., 1992. Rotavírus e adenovírus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem gastroenterite em Goiânia-GO, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34:433-439.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M. et al. The protection of newborn calves against experimental rotavirus infection by feeding mammary secretions from vaccinated cows. *Microbiologica*, v.11, p.379-385, 1988.

CHARLES, T.P.; FURLONG, J., ed. Diarréia dos bezerros. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1992. 107p.

CICIRELLO, H. G.; GLASS, R. I. Current concepts of the epidemiology of diarrheal diseases. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*. v.5, p.163-167, 1994.

COLUCHI, N. B; KROEFF, S. S. Rotavirus, 2000. Disponível em : <<http://icb.usp.br/~mlracz/virus/rota/rotavirus.htm>> Acesso em : 04 de abril . 2009.

COSTA, A.P. et al. Detection of double-stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* , Belo Horizonte, v. 56, n. 4, 2004 .

Coulson, B. S., Grimwood, K., Hudson, I. L., Barnes, G. L. & Bishop, R. F. (1992). Role of coproantibody in clinical protection of children during reinfection with rotavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 1678-1684

De CE, Bergstrom DE, Ho1y A, Montgomery JÁ 1984. Broad spectrum antiviral activity of adenosine analogues. *Antiviral Res* 4: 119-133.

DESSELBERGER, U. (1989). Molecular epidemiology of rotaviruses. In *Viruses and the Gut*, pp. 55-65. Edited by M. J. C. Farthing. London: Swan Press.

Ebina, T., K. Tsukada, K. Umezu, M. Rose, K. Tsuda, H. Hatta, M. Kim, and T. Yamamoto. 1990. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). *Microbiol. Immunol.* 34:617-629.

Estes MK, Kapikian AZ 2007. Rotaviruses. In DM Knipe, PM Howley, *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1917-1974.

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. 2.950p.

Estes, M.K., 2001. Rotaviruses and their replication. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Willimas & Wilkins, Philadelphia, pp. 1747-1785.

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

FERNANDEZ, F.M.; CONNER, M.E.; HODGINS, D.C. 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 particle (VLP) vaccines. *Vaccine*, v.16, p.507-516, 1998.

Fernelius, A.L., Ritchie, A.E., Classick, L.G., Norman, J.O. and Mebus, C.A., 1972. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhea from a field outbreak in Nebraska. *Arch. Virusforsch.* 37, pp. 114–130

Flewett TH, Bryden AS, Oavies H 1973. Virus particles in gastroenteritis. *The Lancet* 2: 1497.

FLEWETT, T. H. et al. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*, 2:61-3, 1974.

GABBAY, Yvone B. et al. Detection of rotavirus in dogs with diarrhea in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 34, n. 1, 2003.

Gentsch, J.R., Woods, P.A., Ramachandran, M., Das, B.K., Leite, J.P., Alfieri, A., Kumar, R., Bhan, M.K. and Glass, R.I., 1996. Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. *J. Infect. Dis.* 174 Suppl. 1, pp. S30–S36.

GOUVEA, V.; SANTOS, N. 1997. Molecular epidemiology of rotavirus in Brazil: a model for the tropics? *Virus Rev. Res.* 2:15-24.

Greenberg, H. B., Valdesuso, J., van Wyke, K., Midthun, K., Walsh, M., McAuliffe, V., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Flores, J., and Hoshino, Y. (1983). Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies directed at two surface proteins of rhesus rotavirus. *J. Virol.* 47, 267±275.

GREGORY, Fábio. Diarréia neonatal: desenvolvimento e avaliação de um método de ELISA para a detecção de rotavirus a partir de material fecal. 1999.113 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, v. 16, n. 3, p. 473- 477, 1982.

HOMEM, V.S.F.; MENDES, Y.G.; LINHARES, A.C.. Gastroenterite canina - agentes virais nas fezes de cães diarreicos e não diarreicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 51, n. 6, 1999.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. *Journal of Health, Population and Nutrition*, v.18, p.5-14, 2000.

HOUSE, J.A. Economic impact of rotaviruses and other neonatal disease agents of animals. *J. Am.Vet. Med.Assoc.*, v. 173, n. 5, p. 573-576, 1978.

JEREZ, J.A.; CANDEIAS, J.A. N.; RÁCZ, M. L.; DURIGON, E. L. Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarreicas de bezerros. *Revista de Microbiol.*, v. 18, n. 3, p.201-204, 1987.

JEREZ, J.A.; CANDEIAS, J.A.N.; DURIGON, E. et al. Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarreicas de bezerros. *Rev. Microbiol.*, v.18, p.201-204, 1987.

KANEENE, J.B.; HURD, H.S. The national animal health monitoring system in Michigan. III - Cost estimates of selected dairy cattle diseases. *Prev. Vet. Med.*, v.8, p.127-140, 1990.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses, In: FIELDS, B. N. *et al.* (Ed.). *Fields Virology*, 2nd ed., New York: Ravens, 1990. p.1353-1404.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N *et al.*, (Ed.). *Fields Virology*, 3rd ed., vol. 2, New York: Raven Press, 1996. p.1657-708.

KAPIKIAN, A.Z; HOSHINO, Y; CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B, Strauss SE (eds), *Fields Virology*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001. p. 1787-1833.

Kitaoka S, Konno, T, De CE 1986. Comparative efficacy of broad-spectrum antiviral agents as inhibitors of rotavirus replication in vitro. *Antiviral Res* 6: 57-65.

Kuroki M, Ohta M, Ikemori Y, Icatlo Jr. F, Kobayashi C, Yokoyama H, Kodama Y 1997. Field evaluation of chicken egg yolk immunoglobulins specific for bovine rotavirus in neonatal calves. *Arch Virol* 142: 843-851.

LAEMMLI, K.U. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, v.227, P. 680 – 685, 1970.

Langoni H. Vacinas: Quando e como usá-las. Fmvz, Unesp, Conpavet, Botucatu-São Paulo. 2004.

Linhares AC, Pinheiro FP, Schmetz C, Muller G, Peters D 1977. Duovírus (rotavírus) em Belém, Pará (nota prévia). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 19: 278-279.

LINHARES, A. C.; BRESEE, J. S. Rotavirus vaccines and vaccination in Latin America. *Pan American Journal of Public Health*. v.8, n.5, p.305-330, 2000.

Linhares, A.C, Araújo .E.C. Justino ,M.C.A. .Rotavíruses. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias-Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LUCCHELLI, A., LANCE, S.E., BARTLETT, P.B. et al. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, p.169-174, 1992.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. Pearson Brasil; 2004.

MASCARENHAS, J. D. P.; GUSMÃO, R. H. P.; BARARDI, C. R. M.; PAIVA, F. L.; SIMÕES, C. O.; GABBAY, Y. B.; MONTEIRO, T. A. F. & LINHARES, A. C., 1999. Characterization of rotavirus P genotypes circulating among paediatric inpatients in northern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 41:165-170.

Matson, D. O., O’Ryan, M. L., Herrera, I., Pickering, L. K. & Estes, M. K. (1993). Fecal antibody responses to symptomatic and asymptomatic rotavirus infections. *Journal of Infectious Diseases* 167, 577-583.

MATTHEWS, R.E.F, 1979. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 12:132-296.

MATTION, N. M. et al. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. *Virology*, v.181, p.295-304, 1991.

MEBUS, C. A. Bovine and ovine rotavirus. In: DINTER, Z.; Morein, B. (Ed.). *Virus infections of ruminants*. New York: Elsevier Science, 1990. p. 239-244.

MEBUS, C. A.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation and characteristics of a corona-like agent. *Am. J. Vet. Res.*, v. 34, p. 173-178, 1973.

MEBUS, C.A; UNDERDAHL, N.R.; RHODES, M.B.; TWIEHAUS, M.J. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from field outbreak. *Nebr. Agric. Experimental Stn Bull.*, n.233, p. 1-16, 1969.

Mori Y, Borgan MA, Ito N, Sugiyama M, Minamoto N 2002. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from group A avian rotaviruses. *Virus Res* 89: 145-151.

MUNFORD, V. Cultivo e caracterização sorológica de rotavirus no Estado de São Paulo. São Paulo: 1995. 98p. [Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].

PARASHAR, U. D. et al. Global illness and Deaths Caused by Rotavirus Disease in Children. *Emerging Infectious Diseases*, v.9, n.5, p.565-571, 2003.

PARREÑO, V.; BÉJAR, C.; VAGNOSSI, A. et al. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.100, p.7-24, 2004.

PATTON, J. T.; SPENCER, E. Genome replication and packaging of segmented double stranded RNA viruses. *Virology*, v.277, p.2147-225, 2000.

PAUL, P. S., Y. S. LYOO (1993): Immunogens of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 37, 299-317

PereiraHG, LinharesAC, Candeias JAN, Glass RI 1993. National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. *Bull PAHO* 27: 1..24-233

PRASAD, B. V. V.; CHIU, W. Structure of rotavirus. In: RAMIG, R. F. (Ed.). *Current Topics in Microbiology and Immunology*, v.185, p.1-27, 1994.

Rácz ML, Candeias JAN, Trabulsi LR, Murahowsky J 1988. Diarrheal diseases in Brazil: clinical features of rotavirus-associated gastroenteritis in children. *Eur J Epidemiol* 4: 382-385.

REINHARDT, G. et al. Aetiological diagnosis of neonatal diarrhoea in calves by means of ELISA. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v. 23, p. 189-192, 1991.

REYNOLDS, D.J.; CHASEY, D.; SCOTT, A.C.; BRIDGER, J.C. Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces. *Vet. Rec.*, v. 114, p. 397-401, 1984.

Rhoads JM, Macleod RJ, Hamilton JR 1988. Effect of glucocorticoid on pig jejunal mucosa during acute viral enteritis. *Pediatr Res* 23: 279-282.

Saif L.J. (1990). – A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? *Cornell Vet.*, 80, 303-311.

SAIF, L.J.; REDMAN, D.R.; THEIL, K.W. Experimental coronavirus infection in calves: Viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 1426-1432, 1986.

Santos N, Hoshino Y 2005. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol* 15: 29-56.

SATO, K.; INABA, Y.; KUROGI, H.; TAKAHASHI, E.; SATODA, K.; OMORI, T.; MATUMOTO, M. Hemagglutination by calf diarrhea coronavirus. *Vet. Microbiol.*, v.2, p.83-87, 1977.

SCHUDEL, A. 1985. Manual de técnicas para la identificación de agentes infecciosos asociados a diarreas neonatales. *FAO Reg. Am. Lat.*

SCHWERS A, VANDEN BC, MAENHOUDT M, BEDUIN JM, WERENNE J, PASTORET PP 1985. Experimental rotavirus diarrhoea in colostrum- deprived newborn calves: assay of treatment by administration of bacterially produced human interferon (Hu-IFN alpha 2). *Ann Rech Vet* 16: 213-218.

SHAH, N. M., JHALA, V. M.. Epizootiological investigations on *Rotavirus* infection in cases of neonatal calf diarrhoea. *Indian Veterinary Journal*, v. 69, p. 5-7, 1992.

Sigolo de San Juan C, Bellinzoni RC, Mattion N, La Torre J, Scodeller EA. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. *Res Vet Sci.* 1986 Sep;41(2):270–272.

SILVA, D.G. et al . Avaliação da imunidade passiva em bezerros nascidos de vacas imunizadas com vacina contra rotavírus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 60, n. 5, Oct. 2008 .

SMEE DF 1982. Inhibition of rotaviruses by selected antiviral substances: mechanisms of viral inhibition and in vivo activity. *Antimicrob Ag Chemother* 21: 66-73.

SNODGRASS, D. R.; TERZOLO, H. R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J. D.; SYNGE, B. A. A etiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.*, v. 119, p. 31-34, 1986.

STEINHOFF MC 1980. Rotaviruses: the first Five years. *J Pediatr* 96: 611-622.

TAKIUCHI, E.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *J Virol Meth*, v. 131, p. 148-154, 2006.

Tamehiro CY, Alfieri AF, Médici KC, Alfieri AA. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. *Brazilian Journal of Microbiology* 2003; 34(4):344-348.

TOMICH, R.G.P. Caracterização do processo saúde-doença em rebanhos bovinos de assentamentos rurais do município de Corumbá, MS. 2007. Tese de Doutorado. Departamento de microbiologia. ICB.UFMG.

TSUNEMITSU, H.; SHIMIZO, M.; HIRAI, T. et al. Protection against bovine rotaviruses in newborn calves by continuous feeding of immune colostrums. *J. Vet. Sci.*, v.51, p.300-308, 1989.

TZIPORI, S. The aetiology and diagnosis of calf diarrhoea. *Vet. Rec.*, v.13, p. 510-515, 1981.

WARD, R. L. et al. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. *Journal of Infectious Diseases*, v.154, p.871-880, 1986.

Ward RL. Mechanisms of protection against rotavirus in human and mice. *Journal Infectious Diseases* 174:551-558, 1996.

White RG, Mebus CA, Twiehaus MJ. Incidence of herds infected with a neonatal Calf Diarrhea Virus (NCDV). *Veterinary Medicine- Small Animal Clinician* 1970; 65:487-490.

WOLF JL, CUKOR G, BLACKLOW NR, DARNBRAUSKAS R, TRIER JS 1981. Susceptibility of mice to rotavirus infection: effects of age and corticosteroid administration. *Infect Immun* 33: 565-574.

WOODE, G. N.; JONES, J.; BRIDGER, J. Levels of colostrum antibodies against neonatal calf diarrhoea virus. *The Veterinary Record*, v.97, p.148-149, 1975.

http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=499&id_pagina=1