

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**DETERMINAÇÃO DE ROTAVÍRUS EM SUÍNOS EM UMA  
GRANJA NO RIO GRANDE DO SUL**

**CACIANO ELONIR ROSA**

**Caxias do Sul**

**2009**

**CACIANO ELONIR ROSA**

**DETERMINAÇÃO DE ROTAVÍRUS EM SUÍNOS EM UMA  
GRANJA NO RIO GRANDE DO SUL**

**Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, visando a  
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.**

**Orientadora : Prof. Dra. Suelen O. Paesi**

**Caxias do Sul**

**2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

R788d Rosa, Caciano Elonir  
Determinação de rotavírus em suínos em uma granja no Rio Grande do Sul / Caciano Elonir Rosa. -- 2009.  
xii, 89 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.  
“Orientação: Prof. Dra. Suelen O. Paesi.”

1. Rotavírus - suínos. 2. Biotecnologia. 3. Carne suína - Brasil. I. Título.

CDU : 578.823:636.4

Índice para o catálogo sistemático:

1. Rotavírus - suínos	578.823:636.4
2. Biotecnologia	57.08
3. Carne suína - Brasil	637.5'64(81)

Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecária  
Criselen Jarabiza – CRB 10/1789

CACIANO ELONIR ROSA

**DETERMINAÇÃO DE ROTAVÍRUS EM SUÍNOS EM UMA  
GRANJA NO RIO GRANDE DO SUL**

**“Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biotecnologia da  
Universidade de Caxias do Sul, visando a  
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.”**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/01/2009

.....  
Orientadora : **Prof. Dra. Suelen O. Paesi**

Comissão Examinadora:

.....  
**Prof. Dra. Maria Lucia Barbosa de Oliveira Racz**

.....  
**Prof. Dr. Fernando Rosado Spilki**

.....  
**Prof. Dr. Diego Bonatto**

Dedico este trabalho aos meus pais Benilde e  
Elonir a minha namorada Lisiane, aos  
meus amigos e a Nossa Senhora

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Benilde e Elonir pelo amor, carinho, amizade onde foram essenciais nos momentos mais difíceis nesta caminhada e também minha gratidão pelos valores e ensinamentos que me foram passados em minha vida;

À minha amada namorada Lisiane pelo amor, incentivo e compreensão nas constantes viagens que tivemos que fazer em virtude deste trabalho;

Aos meus amigos e primos pela amizade nesse período em que estive longe;

À minha irmã Lisiane com quem tive que conviver nesses anos;

À minha amiga Cláudia, que em dois momentos foi fundamental neste caminho;

À Wilson Castro Silva pelo auxílio estatístico e amizade;

A minha orientadora Prof. Dra. Suelen O. Paesi pela oportunidade e orientação na conclusão deste trabalho;

Aos caros amigos e colegas de laboratório, César Schenkel, Daniele Rossi, Denise Zampieri, Phelipe Rodrigues Marocco Dornelles, Felipe da Luz e Guilherme Guzzo;

Aos meus colegas do mestrado Fransoe, Manuela, Nadine, Fernanda Catani, Fernanda Barea, Gustavo e Queli pela amizade que foi crescendo nesses anos;

Aos professores da banca de acompanhamento Prof. Dra. Ana Paula Longaray Delamare e Dr. Diego Bonatto pela amizade nesses anos;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia desta Universidade;

A CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e à Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul;

Por fim, quero agradecer as pessoas que contribuíram de alguma maneira com este trabalho que não fora citadas aqui a todos os meus sinceros agradecimentos.

## INDICE

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>x</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1 Aspectos gerais sobre produção e comercialização da carne suína no Brasil .....	15
2.2 Propriedades gerais dos rotavírus .....	16
2.3 Estrutura e constituição genômica dos rotavírus.....	17
2.3.1 Proteínas estruturais virais .....	18
2.3.2 Proteínas não estruturais virais .....	19
2.4 Classificação .....	20
2.5 Transmissão .....	23
2.6 Replicação .....	23
2.7 Patogenia.....	24
2.8 Diagnóstico .....	26
2.9 Vacina contra Rotavírus .....	28
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1 Objetivo Geral:.....	30
3.2 Objetivos específicos: .....	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 Amostras utilizadas no estudo .....	31
4.2 Amostra padrão .....	31
4.3 Aglutinação do látex (LATEX) .....	31

4.4 Eletroforese de RNA de rotavírus em gel de poliacrilamida (EGPA).....	33
4.4.1 Extração do ácido nucléico viral .....	33
4.4.2 Preparo do gel de poliacrilamida .....	34
4.4.3 Amostra Padrão .....	34
4.5 Teste de enzima-imuno-ensaio (EIE) .....	35
4.5.1. Preparação das amostras de fezes .....	35
4.5.2 Primeira incubação .....	36
4.5.3. Lavagem da microplaca .....	36
4.5.4. Segunda incubação .....	36
4.5.5. Leitura .....	37
4.6 Determinação de génotipos G e P das amostras selecionadas pelas técnicas de EGPA e LATEX. ....	37
4.6.1 Transcrição para cDNA e primeira amplificação de amostras rotavírus positivas .....	37
4.6.2 Segunda amplificação das amostras positivas para Rotavírus (semi-nested PCR).....	38
4.6.3 Análise Eletroforética.....	39
4.7 Análise dos dados.....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
5.1 Identificação de rotavírus por aglutinação de látex .....	42
5.2 Identificação de rotavírus por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	43
5.3 Estudo comparativo entre LATEX e EGPA para detecção do rotavírus em suínos .....	46
5.4 Resultados obtidos com a técnica de EIE .....	50
5.5 Resultados obtidos da genotipagem viral .....	51
5.6 Resultados obtidos do padrão sazonal nesta granja .....	53
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>56</b>



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Primers utilizados para caracterização molecular de segmentos de dsRNA correspondente a proteína VP4 e VP7.....38
- Tabela 2.** Identificação de rotavírus por Aglutinação de Látex em amostras de fezes diarréicas de suínos coletadas em uma granja em Flores da Cunha entre março de 2007 a 2008.....42
- Tabela 3.** Determinação de Rotavírus por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida EGPA em amostras de fezes diarréicas de suínos coletadas em uma granja em Flores da Cunha entre março de 2007 a 2008.....44
- Tabela 4.** Comparação dos resultados obtidos na determinação de rotavírus por aglutinação do látex (LATEX) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) em amostras de fezes diarréicas de suínos.....48
- Tabela 5.** Número de amostras identificadas com cada genótipo considerados isoladamente, através da técnica de semi-nested RT-PCR nas amostras de rotavírus identificadas na granja de Flores da Cunha, entre 2007 e 2008.....51

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem do rotavírus observada ao microscópio eletrônico. (Figura adaptada de Kim *et al.*, 1999).....16
- Figura 2.** Proteínas da partícula de rotavírus codificadas pelos 11 segmentos de dsRNA (esquerda), diagrama esquemático do vírus (centro) e reprodução do vírus por crioeletromicroscopia (direita). (Figura adaptada de Gentsch, *et al.*, 2005).....18
- Figura 3.** Perfis eletroforéticos do genoma viral (dsRNA) do rotavírus dos grupos A, B, C, D, E, F, G. (Figura adaptada de Kapikian *et al.*, 2001).....22
- Figura 4.** Imagem A apresenta um epitélio normal não acometido pelo rotavírus. Imagem B apresenta um epitélio infectado pelo rotavírus. (Figura adaptada de Lece & King, 1978).....25
- Figura 5.** Eletroforese em Gel de poliacrilamida com amostras representativas dos rotavírus em amostras de fecais de suínos coletadas em uma granja em Flores da Cunha entre março de 2007 a 2008.....46
- Figura 6.** Análise por eletroforese em gel de agarose 2,5 % com brometo de etídeo, dos produtos amplificados por RT-PCR de rotavírus provenientes de amostras fecais suínas para determinação dos genótipos G.....52
- Figura 7.** Sazonalidade do rotavírus em amostras de fezes de suínos coletadas em uma fazenda em Flores da Cunha diagnosticadas por LATEX e EGPA no período de 2007 e 2008.....54

## RESUMO

As diarreias, em animais neonatos, constituem numa enfermidade mórbida de distribuição mundial e os rotavirus têm sido apontados como uma das principais causas de gastroenterites de origem viral, especialmente nos países onde a suinocultura é explorada de forma intensiva. Este estudo teve por objetivo ampliar os conhecimentos da incidência e de rotavírus em suínos através das técnicas de aglutinação em látex (LATEX) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Foram analisadas 329 amostras de fezes diarreicas de leitões entre os meses de março de 2007 a março de 2008, provenientes de uma granja localizada no município da serra gaúcha. O resultado da identificação de rotavírus por LATEX usando o kit Rotavírus Latex<sup>®</sup>, foi de 11.6% (38/329) e de 7.9% para EGPA (26/329). A metodologia para determinação de rotavírus por LATEX, mostrou ser mais eficiente que a de eletroforese em gel de poliacrilamida na detecção rotavirus, com uma sensibilidade de 88.4%, especificidade de 95%, valor preditivo positivo de 60.5% e um valor preditivo negativo de 99% e uma correlação de 94.5%. A caracterização molecular das amostras positivas identificou apenas o genótipo G5 e o padrão eletroforético longo em EGPA como vírus circulante no rebanho suíno. Não foram identificadas amostras com misturas de genótipos ou infecções múltiplas e a distribuição sazonal do rotavírus, nesta fazenda, teve picos de incidência entre os meses mais frios do ano.

## ABSTRACT

Diarrhea, in newborn animals, is a morbid disease that exists worldwide; rotaviruses have been considered one of the main causes of gastroenteritis of viral origin, especially in countries where pig farming is intensively explored. The objective of this study was to extend the knowledge about the incidence of rotavirus in pigs, using the latex agglutination test (LAT) and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). This work analyzed 329 samples of diarrheic piglets between March 2007 and March 2008, from a farm in a municipality in Serra Gaúcha. Using LAT, for identification the Rotavirus Latex<sup>®</sup> kit, 11.6% (38/329) of the samples were considered positive, and, using PAGE, 7.9% (26/329) were positive. LAT was considered more sensitive than PAGE in the detection of rotaviruses, showing a sensitivity of 88.4% and a specificity of 95%, positive predictive value of 60.5%, negative predictive value of 99% and a correlation of 94.5%. The molecular characterization of the positive samples identified only the G5 genotype and a long electrophoretic profile in EGPA as the only type of rotavirus circulating in the pig herd. Neither samples with mixed genotype nor multiple infections were identified, and the seasonal distribution of the virus on this farm had higher incidence during the coldest month

## 1. INTRODUÇÃO

A suínocultura brasileira vem apresentando crescimento e resultados que se superam a cada ano. A produção nacional de carne suína cresceu aproximadamente 6.0% em 2006, atingindo 2.86 milhões de toneladas. Posterior há este ano, a estimativa foi superada em mais de 3 milhões de toneladas. O principal destino das exportações de carne suína em 2007 foi à Rússia, Hong Kong e Ucrânia.

O Brasil vem enfrentando nos últimos anos barreiras que tem dificultado suas exportações de carne suína. Atualmente, a sanidade animal contribui para parâmetros de qualidade, interagida com requisitos ligados a qualidade e competitividade em mercados globalizados. Entretanto, o crescimento da suinocultura faz com que os problemas sanitários aumentem, promovendo uma elevada densidade de animais em um mesmo local, possibilitando a ocorrência de surtos e enfermidades que acarretam elevados prejuízos ao setor.

As diarreias em suínos representam uma das principais causas de morbi-mortalidade do período neonatal, caracterizada como uma síndrome de grande complexidade etiológica, que conta com a influência de alterações ambientais, manejo, fatores nutricionais e fisiológicos, os quais cooperam para a mortalidade, redução na conversão animal e custos com tratamento. Como no Brasil onde a suinocultura é explorada de forma intensiva, diversos pesquisadores reconhecem os rotavírus como uma das principais causas de diarreia infecciosa de etiologia viral.

Para o controle das rotaviroses é primordial a identificação precisa do agente no surto de diarreia de modo a se estabelecerem medidas profiláticas direcionadas, para tanto, vários testes têm sido empregados no diagnóstico e caracterização dos rotavírus, incluindo, eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), ensaios imunoenzimáticos como EIE e teste rápido com aglutinação de partículas de látex (LATEX) e também a técnica de reação em cadeia de polimerase (RT-PCR).

A caracterização molecular do rotavírus é de grande importância para a suinocultura para

determinar a incidência, prevalência e os genótipos virais para a aplicação de medidas de prevenção como vacinas e estratégias de manejo. Sendo assim, diante da importância que as diarreias assumem em relação à produtividade das granjas produtoras de suínos o objetivo desse estudo foi determinar e comparar metodologias de identificação desse vírus e fazer a caracterização molecular dos rotavírus em uma granja produtora de suínos localizada na serra gaúcha, no estado do Rio Grande do Sul.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Aspectos gerais sobre produção e comercialização da carne suína no Brasil**

O Brasil tem uma posição de destaque no mercado externo de produção de carne suína ao tornar-se em 2007 o quarto produtor mundial, com 3 milhões de toneladas, ficando atrás dos Estados Unidos com 9,5 milhões de toneladas, União Européia com 21.6 milhões e China com 50 milhões de toneladas. A posição dos seus concorrentes não deverá ser alterada pelo menos a curto e médio prazo, uma vez que a diferença entre eles é significativa (Abipecs, 2008). No Brasil, a concentração da produção suína esta localizada na região Sul com 34.21%, seguido do Nordeste com 23.03%, Sudeste com 18.95%, Centro-oeste com 16.18% e Norte com 7.36% (Corrêa, 2007).

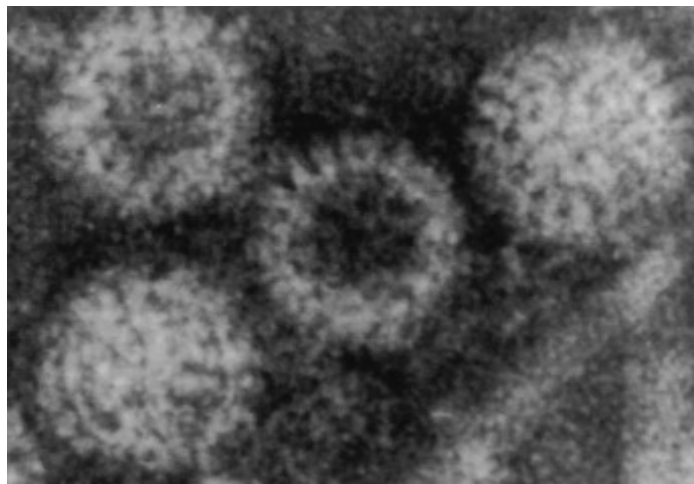
As exportações, que apresentaram uma queda em 2006 por conta do ressurgimento da febre aftosa em bovinos, voltaram a superar a marca de 600 mil toneladas em 2007. Em 2008, até o mês de abril o total de carne suína exportada foi de 159.845 toneladas e a estimativa da associação de criadores do Rio Grande do Sul é chegar a 630 mil toneladas (Acurs, 2008; Abipecs, 2008). Os principais países importadores há mais de cinco anos são os mesmos, pois a dificuldade das autoridades brasileira em certificar a produção, continua a impedir carne suína brasileira como presença em grande parte do mercado mundial. Com relação às exportações, a Rússia permaneceu como o principal destino exportador, respondendo por 53% seguido de Hong Kong , Ucrânia , Cingapura, Moldávia, Argentina e outros (Abipecs, 2008).

O consumo de carne de suína no Brasil é de aproximadamente de 13 a 14 kg/habitante/ano, ao contrário de países como a Dinamarca com 76 kg/habitante/ano (Abipecs, 2008). O Brasil apresenta amplas possibilidades de se firmar como grande fornecedor de proteína animal quando comparado a outros países apresentando um dos menores custos de produção mundial, saúde do rebanho nacional e sanidade animal (Matsubara, 2005; Corrêa, 2007)

Apesar desta situação favorável em que o Brasil se encontra, o crescimento da suínocultura faz com que a densidade de animais em uma mesma área geográfica seja maior, possibilitando a ocorrência de surtos de diarreia onde os rotavírus tem sido reconhecidos como um dos principais agentes causadores de gastroenterites em suínos (Rácz *et al.*, 1988 ; Bittencourt & Rácz, 1992; Pereira *et al.*, 1993)

## 2.2 Propriedades gerais dos rotavírus

Os rotavírus foram descritos pela primeira vez em 1973 na Austrália por Bishop *et al.* (1973), pela identificação de partículas virais em cortes histológicos de mucosa duodenal de crianças com diarreia aguda, identificadas por microscopia eletrônica. As partículas virais observadas foram denominadas de *reovirus-like*, em função da similaridade com os membros da família *Reoviridae*. Inicialmente, Flewett *et al.* (1974) sugeriu o nome rotavírus, em decorrência da semelhança apresentada desses vírus a uma roda com pequenas espículas na sua superfície quando visualizado no microscópio eletrônico, como mostrado na figura 1.



**Figura 1:** Imagem do rotavírus observada ao microscópio eletrônico.( Figura adaptada de Kim *et al.*, 1999).

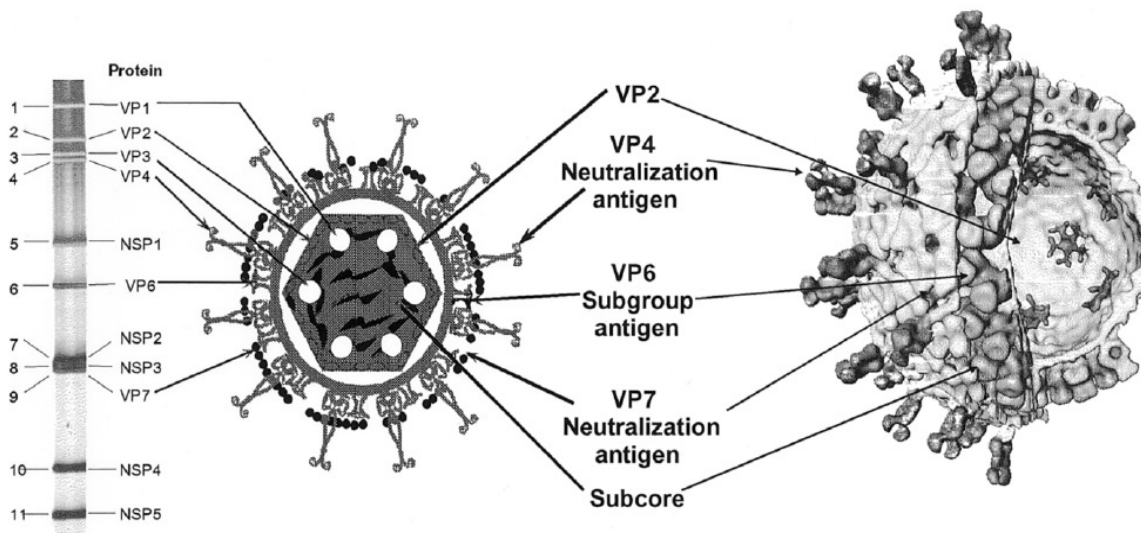


No ano de 1976, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (I.C.T.V.) classificou os *reovirus-like* em um novo gênero, *Rotavirus*, na família *Reoviridae*. Esta classificação é utilizada até o momento. O I.C.T.V. propôs que os rotavírus fossem divididos em sete espécies designadas de Rotavírus A a G (Fauquet *et al.*, 2007).

Na espécie suína, o primeiro caso a ser relatado ocorreu no ano de 1975, quando, Rodger *et al.* (1975), realizaram a primeira identificação de rotavírus em fezes de suíno. No Brasil, a primeira detecção de rotavírus foi descrita em humanos na literatura em 1977 em Belém do Pará por Linhares *et al.* (1977), pelo exame de amostras de fezes de crianças admitidas em um hospital público. Desde então, uma série de estudos têm demonstrado a importância deste vírus com um agente causador de diarreia em humanos e animais (Rácz *et al.*, 1988; Bittencourt & Rácz, 1992; Pereira *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 2003 )

### **2.3 Estrutura e constituição genômica dos rotavírus**

Os rotavírus são partículas de simetria icosaédrica não envelopadas, medindo cerca 100 nm de diâmetro apresentando três camadas protéicas, denominadas como capsídeo externo, capsídeo interno e core, que circundam o genoma do vírus (Estes, 2001). Apresentam seu material genético segmentado constituído por onze segmentos de RNA fita dupla (dsRNA), sendo que o tamanho dos segmentos genômicos varia entre 3302 pares de base (pb) para o maior e o menor com 667 pb (Falconer, *et al.*, 1995), como mostrado na figura 2.



**Figura 2:** Proteínas da partícula de rotavírus codificadas pelos 11 segmentos de dsRNA (esquerda), diagrama esquemático do vírus (centro) e reprodução do vírus por crioeletromicroscopia (direita). (Figura adaptada de Gentsch *et al.*, 2005)

Cada fragmento do RNA viral codifica para uma das seis proteínas estruturais as chamadas VP (Viral Protein) que são denominadas (VP1,VP2,VP3,VP6,VP4,VP7), além das proteínas VP5\* e VP8\* oriundas da clivagem da proteína VP4, e seis proteínas não estruturais NSP (non structural proteins) (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6) não encontradas nas partículas virais e sintetizadas nas células infectadas, tendo como exceção as proteínas NSP5 e NSP6 que são codificadas pela região de sobreposição do segmento onze. (Estes, 2001)

### 2.3.1 Proteínas estruturais virais

As proteínas VP1,VP2 e VP3 formam o core do vírus e são sintetizadas pelos segmentos genômicos um, dois e três, sendo a VP1 constituída por 1.088 aminoácidos, apresentando massa molecular de 123.847 Daltons e representando aproximadamente 2% da massa viral. VP1 é considerada a RNA polimerase do vírus (Estes & Cohen, 1989). A VP2 é constituída por 880 aminoácidos, apresenta massa molecular de 102.431 Daltons e caracteriza-se como a mais

abundante proteína do *core* viral, estando envolvida no processo de organização e replicação do genoma viral (Estes & Cohen, 1989). A proteína VP3 possui 835 aminoácidos, com massa molecular de 98.120 Daltons e possui atividade de guaniltransferase, estando envolvida no processo de adição da estrutura 5'-cap aos transcritos de m-RNAs virais (Patton & Chen, 1999)

A proteína VP4 é codificada pelo quarto segmento do genoma viral, apresenta massa molecular de 86.782 Daltons é composta por 766 aminoácidos (Estes & Cohen, 1989). Ela é clivada por proteases em VP5\*(529aa) e VP8\* (247aa) e compõem, juntamente com a VP7, o capsídeo externo do vírus, sendo responsável pela ligação dos rotavírus aos enterócitos. Nas células animais a ligação é acido-siálico dependente e mediada por VP8\*, e nas células humanas a ligação é mediada por proteínas VP5\* independentemente do ácido siálico (Zárate *et al.*, 2000). O capsídeo interno é formado pela proteína VP6, com massa molecular de 44.816 Daltons e possui 397 aminoácidos sendo codificada pelo segmento genômico seis e representa cerca de 50% a 60% da massa do vírus (Estes & Cohen, 1989). A glicoproteína VP7 é formada por 326 aminoácidos, com massa molecular de 37.368 Daltons, sendo codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9 do ácido ribonucléico do vírus, dependendo da amostra viral. Ela é considerada uma proteína altamente imunogênica que induz a formação de anticorpos neutralizantes e apresenta antígeno específico para sorotipo e genótipos do rotavírus do grupo A (Estes & Cohen, 1989).

### **2.3.2 Proteínas não estruturais virais**

A proteína não estrutural NSP1 se acumula internamente no citoplasma das células infectadas pelo rotavírus. Ela é codificada pelo segmento cinco do RNA viral, com massa molecular de 58.654 Daltons e composta por 491 aminoácidos (Barro & Patton, 2005; Estes & Cohen, 1989). Acredita-se que também possua atividade de ligação com o RNA e esteja associada ao encapsidamento do RNA viral (Okada *et al.*, 1999). As proteínas NSP2 e NSP3 podem ser codificadas pelos segmentos 7, 8 ou 9, dependendo da amostra viral, tendo a NSP2

massa molecular de 36.633 Daltons, composta por 317 aminoácidos e NSP3 possui massa molecular de 34.600 Daltons e 315aa (Estes & Cohen, 1989). A NSP2 liga-se aos 11 segmentos de dsRNA possuindo atividade de replicase viral (Aponte *et al.*, 1996). Já a NSP3 admite-se ainda que essa proteína atua na tradução do mRNA, formando uma ligação entre este e a maquinaria de tradução da célula que está sendo utilizada como hospedeira para o vírus (Vende *et al.*, 2000).

Em relação à NSP4, ela é a única proteína não estrutural que não se liga ao RNA, sendo codificada pelo segmento dez do genoma viral, apresentando 175 aa e massa molecular com cerca de 20.000 Daltons (Estes & Cohen, 1989). É considerada uma enterotoxina viral, capaz de mobilizar íons cálcio do retículo endoplasmático para o citoplasma, alterando a homeostase intracelular e aumentando a secreção de cloretos, levando a diarreia secretora e induzindo a apoptose celular (Ball *et al.*, 1996; Halaihel *et al.*, 2000). Ambas as proteínas NSP5 e NSP6 são codificadas pelo segmento onze, possuindo massa molecular de 21.725 e 12.000 Daltons respectivamente. (Estes & Cohen, 1989). A NSP5 encontra-se localizada no viroplasma, juntamente com NSP2 e, apesar de sua função biológica não estar elucidada, admite-se que possua capacidade de ativar fosfoquinasas celulares (Eichwald *et al.*, 2002; Blackhall *et al.*, 1998). NSP6 é encontrada na célula infectada pelo vírus sob a forma de inclusões citoplasmáticas, formando complexos com a NSP5, com possível envolvimento no processo de replicação viral (González *et al.*, 1998; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

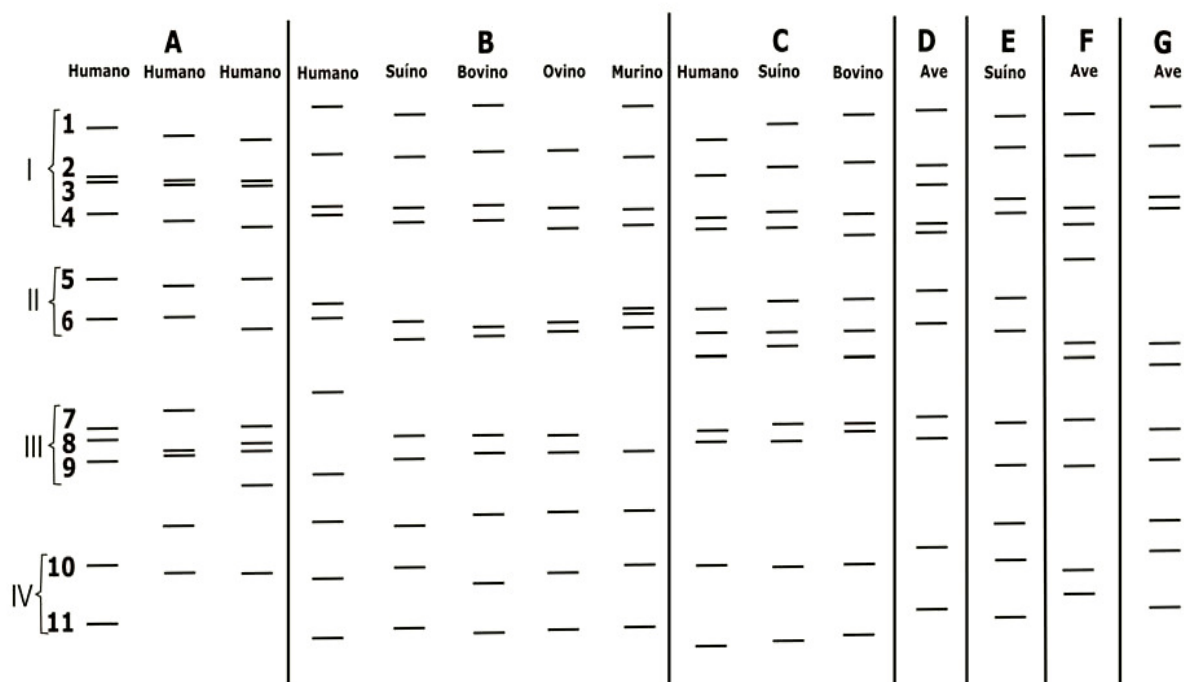
## **2.4 Classificação**

Com base na variação antigênica da proteína VP6, os rotavírus são classificados em 7 grupos de (A a G), que apresentam subdivisões em subgrupos e sorotipos/genótipos. O grupo A pode ainda ser classificado em quatro subgrupos; I, II, I +II e não-I não-II (Ho *et al.*, 1988; Krishnan *et al.*, 1994; Estes, 2001). As variações para sorotipos/genótipos são determinadas pelas proteínas

estruturais VP4 e VP7 do capsídeo externo ou seus respectivos genes (Estes, 2001). A proteína VP7 define os chamados sorotipo/genótipo G denominada assim por ser uma glicoproteína. Para glicoproteína VP7, a nomenclatura de classificação é sempre G, independentemente de sorotipo e genótipo. A análise através de PCR( polymerase chain reaction-reação em cadeia pela polimerase), sequenciamento, ensaios de neutralização e hibridização permitiu identificar até o momento 16 sorotipos/genótipos G, dez destes isolados em humanos com predominância de G1-G4, e para suínos os mais comuns isolados foram G3, G4, G5 e G11 (Estes, 2001, Gulati *et al.*, 2007).

Já a VP4 classifica os rotavírus do grupo A em sorotipos/genótipos P, assim denominada por ser sensível a proteases ( Estes, 2001). Utilizando métodos sorológicos têm sido identificados os sorotipos P e por métodos moleculares identificam-se os genótipos P, os quais nem sempre são coincidente (Estes, 2001). A nomenclatura dos sorotipos e genótipos P utiliza letra P seguida de número quando se referir a sorotipo e com número dentro do colchete quando se referir a genótipo. Em relação a VP4 12 sorotipos e 27 genótipos P foram isolados de humanos e animais, embora pelo menos os quatro tipos (P1[8], P1[4], P2[6] e P8[11]) ocorram mais em humanos e P[6] e P[7] são genótipos mais comuns em suínos (Gentsch *et al.*, 1996; Estes, 2001, Maneekarn *et al.*, 2006).

Os rotavírus também tem sido classificados de acordo com o peso molecular e velocidade de migração de cada segmento genômico através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), apresentando um perfil eletroforético típico para este vírus (Gombold *et al.*, 1994). O padrão eletroforético do rotavírus apresenta uma migração distinta sendo 4 segmentos de (dsRNA) de alto peso molecular (1 a 4), dois segmentos de médio peso molecular( 5 e 6), um com segmento diferencial (7 a 9) e por fim um grupo com 2 mais leves e menores (10 e 11) (Estes, 2001) conforme mostrado na figura 3.



**Figura 3:** Perfis eletroforéticos do genoma viral (dsRNA) do rotavírus dos grupos A, B, C, D, E, F, G. (Figura adaptada de Kapikian *et al.*, 2001).

Os padrões de migração das bandas dez e onze no gel de poliacrilamida foram definidos para os rotavírus do grupo A para determinar a classificação de três perfis de migração: longo, onde o segmento dez e onze tem uma migração mais rápida, curto, ao qual o segmento onze apresenta migração mais lenta; ficando posicionado antes do dez e o supercurto, onde os segmentos 10 e 11 ficam muito próximos um dos outros o que dificulta a sua visualização (Nuttall *et al.*, 1989; El-Assouli, 1996). Quando não é observado o perfil de migração típico dos rotavírus do grupo A, a cepa que está sendo estudada pode pertencer a outro grupo de rotavírus, a uma cepa de rotavírus aviário ou então, a uma cepa de rotavírus que sofreu um rearranjo entre os segmentos genômicos (Estes, 2001). Os fenômenos de recombinações são descritos como um processo no qual moléculas de DNA são clivadas e os fragmentos religados em novas combinações (Tian *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2003). A ocorrência deste fenômeno poderia explicar os perfis curto, super-curto e longo no segmento 11. Os rotavírus do grupo A podem ainda sofrer uma reestruturação onde, a troca de segmentos gênicos entre cepas diferentes que infectam uma mesma célula ocorre durante uma infecção mista (Estes, 2001).

## 2.5 Transmissão

A transmissão dos rotavírus se dá pela via fecal-oral e pela ingestão de alimentos ou água contaminados pelo vírus, apesar de ter sido descrita na literatura também a contaminação eventual por via respiratória (Linhares *et al.*, 1981; Gurwith *et al.*, 1981; Estes & Cohen 1989). A veiculação através da água tem sido evidenciada durante todas as estações, porém com uma maior frequência durante o inverno, resultado da ingestão de água contaminada por descargas de esgoto (Kapikian & Chanock 1996; Mehnert & Stewien, 1993; Mehnert *et al.*, 1999; Gofiti-Laroche *et al.*, 2001; Frost *et al.*, 2002; Borchardt *et al.*, 2003; Lopman *et al.*, 2003).

O contato dos leitões com a matéria fecal é o fator mais importante para o surgimento da infecção e para a sua difusão na granja. Tanto animais domésticos, roedores e também o homem podem ser portadores e atuar como fontes de transmissão do vírus (Sobestiasky *et al.*, 1999)

Durante o período de infecção ocorre uma elevada excreção de partículas virais nas fezes chegando a um trilhão de partículas/ml de fezes, e a carga infectante para que ocorra a transmissão do rotavírus é de uma a 100 partículas virais, o que demonstra a elevada infectividade deste vírus (Vesikari *et al.*, 1981; Ward *et al.*, 1986). Além disso, os vírions são resistentes a inativação física e promovem altas taxas de infecções nosocomiais o que reforçam a contaminação ambiental como uma importante fonte de infecção (Aitken & Jeffries, 2001; Swierkoz, 2001)

## 2.6 Replicação

Os rotavírus possuem tropismo celular por enterócitos maduros das vilosidades do intestino delgado, particularmente da mucosa do jejuno (Bass *et al.*, 1990). A entrada na célula hospedeira envolve as etapas do reconhecimento de receptores e co-receptores celulares e também a clivagem proteolítica da proteína viral (Mendez *et al.*, 1999). A ligação do rotavírus à célula é determinada

pela proteína VP4, após a clivagem pela tripsina pancreática em VP5\* e VP8\*( Ludert *et al.*, 1996).

A penetração na célula é mediada por VP4 e VP7, por meio de interações com receptores celulares contendo ácido siálico e através das integrinas  $\alpha 2\beta 1$  e  $\alpha 4\beta 1$  no início do processo de absorção, com o domínio VP8\* interagindo com ácido siálico e VP5\* com integrinas (Hewish *et al.*, 2000; Guerrero *et al.*, 2000; Ciarlet *et al.*, 2002; Lopez & Arias, 2004). A replicação do vírus ocorre no citoplasma onde os mRNA são sintetizados seguindo uma ordem, inicialmente pelos segmentos menores e posteriormente pelos segmentos maiores (Patton & Gallegos, 1990). Os mRNAs são utilizados como moldes para a síntese dos onze segmentos de fita negativa que vão compor os RNAs genômicos (Chen *et al.*, 1994). As proteínas que foram codificadas pelo genoma do vírus são sintetizadas em ribossomos livres, tendo como exceção VP7 e NSP4, que são sintetizadas em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (Estes, 2001).

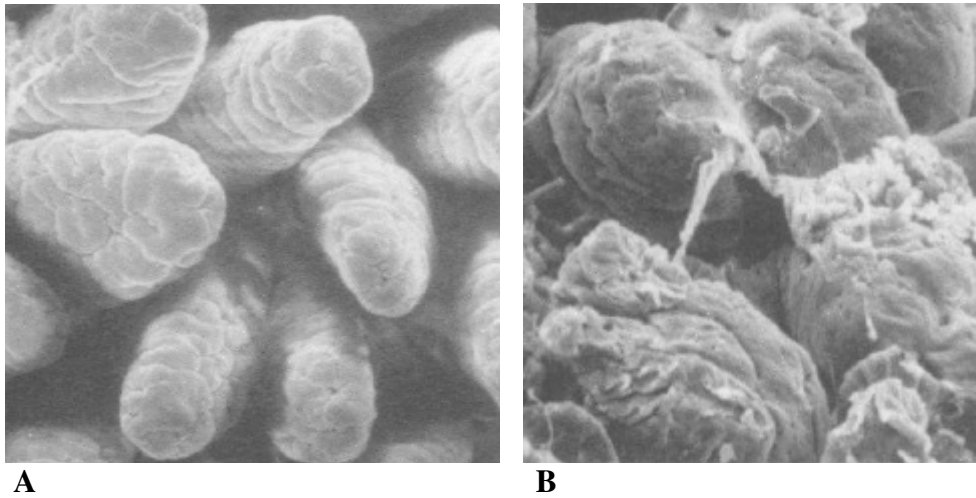
A montagem das partículas do *core viral* e a VP6, parecem ocorrer em estruturas eletrodensas perinucleares, denominadas de viroplasma (Estes, 2001). A maturação final do vírus ocorre no interior do retículo endoplasmático rugoso, sendo dependente de íons  $Ca^{2+}$  e transitoriamente sendo envelopada. No processo final, as partículas vão receber o capsídeo externo composto pelas proteínas estruturais VP4 e VP7, antes ou após o brotamento a partir do retículo endoplasmático, sendo então liberadas após a lise celular e infectando outros enterócitos (Estes, 2001).

## **2.7 Patogenia**

Ao infectar enterócitos maduros nas porções média e alta das vilosidades do intestino delgado de animais e humanos, os rotavírus causam diarreia aquosa e abundante, ocorrendo morte e descamação destas células, que são substituídas por células imaturas que possuem capacidade de absorção reduzida (Venkataram & Estes 1997). Durante a ocorrência da diarreia acaba ocorrendo



uma diminuição na digestão de açúcares e na absorção de sais minerais e água, aumentando a gravidade da doença (Kapikian & Chanock, 1996).



**Figura 4:** Imagem A apresenta um epitélio normal não acometido pelo rotavírus. Imagem B apresenta um epitélio infectado pelo rotavírus.(Figura adaptada de Lece & King, 1978 )

Outro fator importante que está relacionado à gravidade da infecção pelo rotavírus é a presença da proteína não estrutural NSP4 que possui uma atividade semelhante à enterotoxinas bacterianas. Ela interage provavelmente na mediação da diarreia, afetando locais do intestino ainda não infectados pelo vírus que resulta na alteração da permeabilidade celular (Ramig, 2004). Outro mecanismo que também é usado para explicar a secreção de fluídos e eletrólitos que ocorrem durante a infecção esta baseada na capacidade de ativar o sistema nervoso entérico no qual a presença do vírus ou a ação de NSP4 levam as células infectadas a liberar citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico que ativam este sistema que atua aumentando a secreção (Lundgren & Svesson, 2001).

A ligação de NSP4 perturba a via de transdução de sinais promovendo uma alteração do retículo endoplasmático rugoso, que desencadeia a liberação de íons  $Ca^{2+}$  do RER para o citoplasma, acarretando a ativação de enzimas intracelulares, que acarreta a ruptura do citoesqueleto das vilosidades (Jourdan *et al.*, 1998). Ela causa ainda a diminuição da síntese de enzimas digestivas pelas células apicais que acarretam a uma baixa na síntese de dissacarídeos que também

promovem a inibição do transporte de íons  $\text{Na}^+$  e de outros solutos, que contribuem para a redução da capacidade de absorção do epitélio ( Ramig, 2004; Mir *et al.*, 2007)

Em suínos, a ocorrência das lesões macroscópicas associadas à infecção pelo rotavírus tem sido relatada como o adelgamento de parede do intestino, e as lesões microscópicas incluem o encurtamento e atrofia das vilosidades intestinais ocorrendo à conversão do epitélio normal em epitélio cuboidal. Os rotavírus de suínos têm mostrado diferir dos rotavírus bovinos, até certo grau, na habilidade de causar lesões histopatológicas (Collins *et al.*, 1989). As alterações morfológicas resultantes da ação do rotavírus se traduzem por metaplasia epitelial das vilosidades, hiperplasia das criptas, rarefação das microvilosidades e moderada infiltração mononuclear da lamina própria e presença de microvilosidades esparsas e irregulares (Bishop *et al.*, 1973 Blacklow & Greenberg, 1991; Moon, 1994).

## **2.8 Diagnóstico**

O quadro laboratorial que o rotavírus apresenta não gera sintomas característicos e específicos para que se possa concluir um diagnóstico apenas com base na sintomatologia, uma vez que outras infecções virais também possam gerar quadros clínicos de gastroenterites e sintomas aos causados durante a infecção pelo rotavírus (Estes & Kpapikian, 2007).

Algumas características das infecções por rotavírus como a presença de uma grande quantidade de partículas virais nas fezes permitiu o desenvolvimento vários métodos de detecção dentre eles a primeira técnica a ser utilizada foi a microscopia eletrônica que tem sido usada para a identificação direta do vírus nas fezes, porém ela é requerida para resolver discrepâncias de resultados obtidos por outras técnicas, já que permite a detecção do vírus em 80% a 90% das amostras positivas (Flewett *et al.*, 1973; Bishop *et al.*, 1973; Brandt *et al.*, 1981; Landaeta *et al.*, 2003). Entretanto, sua utilização torna-se inviável quando se trata de um grande número de

amostras e também os custos elevados do equipamento e a necessidade de pessoal treinado para a leitura são fatores que limitam o uso desta técnica (Ellen *et al.*, 1978). A imunomicroscopia eletrônica que utiliza anticorpos para agregação das partículas virais, possui as mesmas características da microscopia eletrônica, mas tem uma maior especificidade por utilizar anticorpos específicos anti rotavírus porém, a sua utilização é questionada porque a morfologia dos rotavírus é característica, podendo ser feita sem a utilização de um soro imune (Nataka *et al.*, 1987; Suzuki *et al.*, 1987; Estes & Kapikian, 2007)

A metodologia de escolha empregada para detecção do antígeno viral é o ensaio imunoenzimático, que detecta antígenos virais nas fezes, e é disponível comercialmente para o diagnóstico de rotavírus com base na utilização de anticorpos policlonais a utilização de “kits” comerciais torna tal técnica acessível e a laboratórios de rotina e que permite testar várias amostras simultaneamente (Yolken *et al.*, 1977; Ellen *et al.*, 1978; Pereira *et al.*, 1985).

Outra técnica importante no diagnóstico dos rotavírus é a aglutinação com partículas de látex, envolvendo microesferas sensibilizadas com anticorpos anti rotavírus. Esta metodologia tem por princípio a detecção de antígenos virais nas fezes, possuindo uma sensibilidade compatível a técnica de ensaio imunoenzimático (EIE) apresentando resultados rápidos e por este motivo recomendado para o uso de clínico (Brandt *et al.*, 1987; Gabbay *et al.*, 2005)

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) configura-se como recurso para a detecção do genoma viral apresentando sensibilidade e especificidade elevadas, que possibilitam a detecção de perfis genômicos, mesmo daqueles rotavírus atípicos (B,C,D,E e F) (Taniguchi & Urasawa, 1995)

Com o emprego da biologia molecular a técnica de (RT-PCR) é baseada na reação em cadeia da polimerase precedida da transcrição reversa, fundamentando-se na amplificação enzimática dos genes 7, 8 ou 9 (tipo G) e 4 (tipo P), utilizando iniciadores consensuais específicos apresentando altas sensibilidade e especificidade (Gouvea *et al.*, 1990; Gentsch *et al.*, 1992; Das *et al.*, 1994). O desenvolvimento da técnica de RT-PCR em tempo real permitiu uma variação desta técnica que

apresenta-se mais sensível e permite quantificar a carga viral durante uma infecção( Kang *et al.*, 2004)

A hibridização molecular é baseada na utilização de sondas de RNA marcadas com enzimas ou radioisótopos, que se ligam a fitas do DNA alvo do vírus o qual foi transferido para uma membrana de *nylon*, apresentando uma formação de híbridos (RNA-DNA), sendo capturados por anticorpos marcados e fosfatase alcalina e quimioluminescência (Leite *et al.*, 1996)

Com a utilização do sequenciamento genômico, é possível o estudo evolutivo dos rotavírus circulantes em cada região, contribuindo e ampliando dados epidemiológicos sobre este vírus completando e certificando resultados obtidos por outras técnicas (Gault *et al.*, 1999; Adah *et al.*, 2002; Martela *et al.*, 2005)

Os rotavírus também podem ser identificados através do isolamento em cultura com a utilização de linhagem MA104 (originárias de rim de macaco) e CaCo-2 (originárias de células de carcinoma de cérvix uterina). Entretanto, a propagação do vírus é muito lenta limitando-se à investigação científica (Smith *et al.*, 1979; Ward *et al.*, 1984; Yolken & Wilde, 1994; Kapikian *et al.*, 2001)

## **2.9 Vacina contra Rotavírus**

A primeira vacina contra rotavírus foi desenvolvida em 1983 sendo derivada de uma cepa bovina RIT-4237 e por não apresentar resultados favoráveis em testes realizados em países em desenvolvimento as pesquisas com esta vacina foram encerradas(Vesikari *et al.*, 1984; Glass *et al.*, 2006).

Após este período, em 1998 foi licenciada nos Estados Unidos a primeira vacina contra rotavírus ,denominada Rotashield<sup>®</sup> (Wyeth-Lederle, Pearl River, N Y, USA). Por ser uma vacina tetravalente e ser formada pela cepa de macaco Rhesus, tendo semelhança a G3 Humana e por três

cepas “rearranjadas” Rhesus-humano contendo os genes que irão codificar as proteínas do capsídeo viral externo dos sorotipos humanos mais comuns G1, G2 e G4. Em 1999, esta vacina teve seu uso suspenso após ter sido relatado casos de intussuscepção, ocorridos após a administração da primeira dose nas duas primeiras semanas, entre crianças vacinadas (Kapikian *et al.*, 1996; Glass *et al.*, 2006).

A vacina desenvolvida pela (Merck<sup>®</sup>) denominada de Rotateq<sup>®</sup> é uma vacina pentavalente constituída a partir da cepa bovina WC3 “reestruturada” com os genótipos( G1,G2,G3,G4 e P[8]) que foi licenciada pela US Food and Drug Administration em fevereiro de 2006 (Clark *et al.*, 1996; Bresee *et al.*, 2005; Glass *et al.*, 2006) e no Brasil em 2008. A vacina G1P[8] Rotarix<sup>®</sup> desenvolvida pela (GlaxoSmithKine) é monovalente e formada pela cepa RIX 4414 sendo administrada em duas doses por via oral. Como a infecção por rotavírus humano pode gerar proteção heterotípica, pela reação cruzada de antígenos esta vacina baseia-se neste conceito (Bernstein *et al.*, 1999; Gentsch *et al.*, 2005)

A vacina tríplice PORCILIS<sup>®</sup> 2\*4\*3 produzida pela empresa (Intervet/Schering-Plough Animal Health) foi desenvolvida para proteger leitões contra os principais agentes causadores de diarreia. Ela é formada pelas fímbrias da *E. coli* K88, K99, 987P, F41, Toxóide do *C. perfringens* tipo C e sorotipos do grupo A de Rotavírus (Vivos liofilizados) G5 e G4 , sendo indicada para auxiliar no controle da Colibacilose Neonatal, causada pelas cepas ETEC da *E. coli*, da Enterotoxemia causada pelo *C. perfringens* tipo C e da Rotavirose causada pelos Rotavírus G5 e G4 (Intervet, 2008).

Devido à diversidade antigênica dos rotavírus e a possibilidade de ocorrer mutações em seu genoma, é muito importante se fazer um monitoramento das cepas circulantes para que se possa implantar e desenvolver novas vacinas e ainda estabelecer mudanças importantes no padrão epidemiológico deste vírus (Bresee *et al.*, 2005; Gentsch *et al.*, 2005; Santos & Hoshino, 2005).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral:**

Identificação e caracterização de rotavírus em amostras fecais diarréicas suínas, em uma granja em Flores da Cunha, no Rio Grande do Sul.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Determinar a porcentagem de positividade para rotavírus em amostras diarréicas de suínos.
- Comparar a eficiências das metodologias de latex e EGPA na identificação de rotavírus em suíno.
- Identificar os casos ocorridos por dupla infecção.
- Caracterizar molecularmente as amostras positivas para rotavírus suíno.
- Definir a sazonalidade da diarréia e do rotavírus no rebanho suíno da granja.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Amostras utilizadas no estudo**

A amostra desta pesquisa foi escolhida de acordo com Roehle *et al.*, (1989), para uma expectativa de prevalência entre 15% a 20%, com precisão absoluta de 5 %, com um nível de confiança de 95% totalizando 329 amostras diarréicas coletadas de leitões com idade entre 1 a 40 dias entre os meses de março de 2007 a março de 2008, provenientes de uma granja produtora de leitões, com 200 matrizes, localizada na serra gaúcha, no estado do Rio Grande do Sul, apresentando em média de 25 amostras mensais.

Estas amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico Molecular da Universidade de Caxias do Sul e armazenadas a -20°C até o momento da análise. Para a identificação do rotavírus as amostras foram submetidas às metodologias de EGPA, LATEX, EIE, como descrito a seguir.

### **4.2 Amostra padrão**

Durante o estudo foram utilizadas as cepas SA11 de sítio cedida pela Dra. Maria-Lúcia Rácz (Departamento de Microbiologia– Instituto de Ciências Biomédicas USP) e a cepa LDM 187 de origem humana para rotavírus A.

### **4.3 Aglutinação em látex (LATEX)**

O “kit” utilizado neste estudo foi o Rotavírus Látex<sup>®</sup> BTI- Bio Tecnologia Industrial Ltda, Belo Horizonte-MG-Brasil; distribuição Richimond Immunsystems Diagnostics Ltda, São Paulo-SP-Brazil. Este é um teste rápido em lâmina a base de látex recoberto com anticorpos policlonais

específicos para os rotavírus do grupo A, licenciado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para uso em diagnósticos laboratoriais em amostras fecais humanas. Este kit que foi utilizado para os testes de acordo com as instruções do fabricante.

O “kit” Rotavírus Látex<sup>®</sup> consistem: (a) Suspensão de partículas de látex de poliestireno, sensibilizadas com imunoglobulinas de coelho anti-rotavírus em solução tamponada (R1), (b) Suspensão de partículas de látex de poliestireno sensibilizadas com imunoglobulinas de coelho não-reativas para rotavírus, em solução tamponada (R2), (c) um controle positivo de suspensão de partículas virais de rotavírus (cepa SA-11) inativados (R3), (d) uma suspensão de solução salina tamponada (R4), (e) varetas plásticas para mistura, e (f) uma lâmina de fundo escuro.

As partículas de látex reagem formando a reação antígeno-anticorpo devido à presença de antígeno de rotavírus na suspensão de látex, perdendo seu aspecto uniforme, formando-se uma nítida aglutinação. Esta aglutinação ocorre quando antígenos virais do grupo rotavírus presentes nas fezes reagem com as imunoglobulinas específicas unidas às partículas de látex, iniciando a formação de uma rede entre as mesmas.

Uma quantidade de 0,1g ou 100 µL da amostra de fezes foi adicionada a 0,5 mL de tampão em diluente e após homogenizada, e centrifugada por 10 minutos a 800xg. Em seguida foram transferidos para a lâmina de fundo escuro uma gota de 25 µL do reagente R1 e uma gota 25 µL do reagente R2 . O teste foi realizado com uma gota 25 µL do sobrenadante de fezes que foi adicionada a cada círculo e misturada com os reagentes usando as varetas plásticas. A lâmina de vidro foi agitada de modo circular manualmente por 2 minutos, a temperatura de ambiente. Os padrões de aglutinação foram lidos então sob a luz fluorescente existente no laboratório. Os resultados foram considerados positivos quando ocorria aglutinação visível e negativa quando a suspensão permanecia leitosa após 2 minutos. Os testes foram considerados indeterminados se houvesse uma aglutinação somente com a suspensão R2 ou com as suspensões R1 e R2.

As amostras que exibiram reações indeterminadas foram retestadas pelo método EIE utilizando o kit RIDASCREEN<sup>®</sup> Rotavírus (R-Biopharm AG, Landwehrstr. 54,D-64293 Darmstadt,



Alemanha). Os reagentes: controle positivo (antígeno) e controle negativo (tampão) foram usados para o controle de qualidade do procedimento antes de cada bateria de testes.

#### **4.4 Eletroforese de RNA de rotavírus em gel de poliacrilamida (EGPA).**

A técnica de EGPA foi realizada de acordo com o protocolo seguido por Pereira *et al.*, (1983), e os géis corados com nitrato de prata de acordo com Hering *et al.* (1982).

##### **4.4.1 Extração do ácido nucléico viral**

Em tubos contendo 400 µl da suspensão fecal a 20% foram acrescentados 40 µl de acetato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na) 1M e 400 µl de solução fenol/clorofórmio. Após agitação de um minuto, os tubos foram centrifugados a 5900xg por 2 minutos em centrífuga *Eppendorf* (modelo 5417-R). Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos aos quais foram adicionados 800 µl de etanol absoluto estocado a -20°C. Após agitação os tubos foram incubados por uma noite (18 horas) a -20°C.

Após este período, foram centrifugados novamente a 800 g por 10 minutos em centrífuga para tubos *Eppendorf* (modelo 5417-R). Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram secos com os tubos em posição invertida à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos em 20 µl de dissociador de amostra ( 0,0625 M Tris/HCl, pH 6,8; 5M uréia; 3%SDS; 5% 2-mercapto-etanol; 0,01% de azul de bromofenol) e incubados por 15 minutos a 56 °C.

#### **4.4.2 Preparo do gel de poliacrilamida**

Foram montadas camaras preparadas com duas placas de vidro separadas entre si por um espaçador de 1mm, as quais foi adicionado o gel inferior (acrilamida 7.5%-/bisacrilamida 0.2% em tampão Tris/HCl 3mM pH8.8; 0.03mM de persulfato de amônia; 0.2% de TEMED). Após sua polimerização, foi adicionado o gel superior (acrilamida 3.5%-/bisacrilamida 0.045% em tampão Tris/HCl 6mM pH8.8; 0.015mM de persulfato de amônia; 0.2% de TEMED), e imediatamente introduzido o pente para a formação de canaletas para a colocação das amostras, preparadas como descrito no item anterior. Após sua polimerização, foi adicionado o tampão de corrida (Tris 0.01%, glicina 0.083M, pH 8.3) ao seu reservatório. Após a retirada do pente, cada amostra a ser analisada foi colocada na canaleta para a corrida eletroforética, que ocorreu utilizando 20mA/placa, durante 16 horas.

A coloração do gel foi realizada de acordo com Hering *et al.* (1982). Depois da retirada das placas da cuba, os vidros são separados e o gel é transferido para uma solução fixadora de etanol 10% e ácido acético 0.5%, por 30 minutos; a seguir, o gel é transferido para uma solução corante de nitrato de prata 0.011 M por mais 30 minutos, com agitações periódicas. Desprezou-se a solução corante e o gel foi lavado por 2 vezes em água destilada e em seguida foi acrescida a solução reveladora de hidróxido de sódio (NaOH) 0.75 M e formaldeído 0.95%. Após a visualização das bandas a revelação foi interrompida pela adição de uma solução de ácido acético 5% por 15 minutos. Na seqüência o gel é mantido em uma solução de etanol a 10%, que funciona como conservante do gel até o momento de fotografar.

#### **4.4.3 Amostra Padrão**

Em todas as corridas eletroforéticas foi incluída, como amostra padrão, uma amostra de rotavírus do grupo A de origem humana (LDM 187), cujo dsRNA foi extraído conforme descrito acima.

#### **4.5 Ensaio imunoenzimático (EIE)**

O kit de ensaio imunoenzimático utilizado neste estudo foi o RIDASCREEN® Rotavírus (R-Biopharm AG, Landwehrstr. 54, D-64293 Darmstadt, Alemanha). Este teste utiliza anticorpos monoclonais em um processo do tipo sanduíche. A superfície do fundo da microplaca foi sensibilizado com um anticorpo monoclonal contra a proteína VP6 dos rotavírus, tratando-se de um antígeno específico que ocorre em todos os rotavírus patogênicos.

Uma suspensão da amostra de fezes a ser analisada foi pipetada, em conjunto com um outro anticorpo monoclonal antirotavírus, conjugado com peroxidase de rábano silvestre, para a incubação na cavidade da microplaca do teste. Na presença de antígenos de rotavírus forma-se um complexo sanduíche com os anticorpos imobilizados, o antígeno rotavírus e o anticorpo conjugado com a peroxidase de rábano silvestre. Os anticorpos marcados com enzima não ligados são retirados com as lavagens da micro placa. Após a adição de substrato incolor, a enzima ligada converte as amostras positivas em uma solução azul. Através da adição do reagente bloqueador ocorre uma mudança de cor de azul para amarelo. A coloração é proporcional à concentração dos antígenos dos rotavírus disponíveis na amostra que foi analisada.

##### **4.5.1. Preparação das amostras de fezes**

Para a execução deste teste foram seguidas as normas do fabricante. Em um tubo foi colocado 1 ml de tampão de diluição de amostra e uma quantidade equivalente de fezes (50-100 mg). Em seguida foi feita homogeneização da suspensão de fezes em um vortex. Após um curto período de repouso para a sedimentação de partículas maiores de fezes foi utilizado o sobrenadante diretamente no teste.

#### **4.5.2 Primeira incubação**

Após colocar um número suficiente de cavidades nos quadros de suporte, 100µl da suspensão das amostras de fezes foram gotejados nas cavidades. Em seguida foi colocado em uma cavidade 2 gotas (100µl) controle positivo (Control +) e em outra cavidade, 100µl do tampão de diluição das amostras (Diluent 1 = controle negativo). Depois são adicionadas 2 gotas (100 µl) do anticorpo conjugado (Conjugate) com enzima. A mistura total foi incubada por 60 minutos a temperatura ambiente (20–25 °C).

#### **4.5.3. Lavagem da microplaca**

As cavidades foram esvaziadas em um contentor de lixo com hipoclorito para a desinfecção. Depois a placa foi seca em papel absorvente para retirar restos de umidade provenientes do teste. Então, lavou-se 5 vezes, cada vez com 300 µl de tampão de lavagem. Com isso, foi feito um esvaziamento completo após cada lavagem, batendo em uma parte seca e inutilizada do papel.

#### **4.5.4. Segunda incubação**

Após a lavagem da microplaca foi adicionado 100 µl de substrato em todas as cavidades. Depois a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente (20 –25 °C) no escuro. Após a reação foi interrompida com a adição de 50 µl de reagente bloqueador (Stop) em todas as cavidades. A absorbância foi medida a 450 nm.

#### **4.5.5. Leitura**

A leitura foi feita por medida da densidade óptica em leitor espectrofotométrico (Espectramax 190) com filtro de 450 nm. Para a determinação do valor marginal, 0.15 das unidades de absorvância são adicionados à absorvância medida do controle negativo.

As amostras onde o valor da absorvância ficou mais de 10% acima do valor marginal calculado são consideradas positivas. As amostras que ficam mais de 10% abaixo do valor marginal calculado devem ser consideradas negativas. As amostras cujo valor de absorvância ficou na área de 10% acima e abaixo do valor marginal são consideradas marginais e foram repetidas. Se um exame repetido com uma amostra fresca ficou novamente na área cinza, a amostra foi considerada negativa.

#### **4.6 Determinação de genótipos G e P das amostras selecionadas pelas técnicas de EGPA e LATEX.**

Para a caracterização das amostras rotavírus positivas foi utilizada a RT-PCR com primers específicos para os genótipos mais comuns em animais. Na determinação dos genótipos G foram utilizadas as técnicas descritas por Das *et al.* (1990), Gouvea *et al.* (1994) e na determinação dos genótipos P as técnicas preconizadas por (Gouvea *et al.*, 1994 e Gentsch *et al.*, 1992 (Tabela 1).

##### **4.6.1 Transcrição reversa para cDNA e primeira amplificação de amostras rotavírus positivas**

Foi preparada uma mistura de reagentes (*master mix*) composta de 10µl de tampão de enzima 10X, 8 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 8 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl da mistura de iniciadores G ou P, 64.48 µl de água MILLI-Q, 0.02 µl de transcriptase reversa e 0.5 µl da enzima Taq-DNA polimerase. Após a

homogenização e rápida centrifugação as misturas foram amplificadas no termociclador MJResearch mod. PTC 100 como descrito no experimento de Gouvea *et al.* (1994).

#### 4.6.2 Segunda amplificação das amostras positivas para rotavírus (semi-nested PCR)

A mistura dos reagentes foram composta de 10µl de tampão de enzima 10X, 8 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 8 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl da mistura de primers para G e P, 71.5 µl de água MILLI-Q e 0.5 da enzima Taq-DNA polimerase. Após os reagentes foram divididos em volumes 100 µl por tubo e acrescido de 1 µl da primeira amplificação.

**Tabela 1.** Primers utilizados para caracterização molecular de segmentos de dsRNA correspondente a proteína VP4 e VP7

Primer	Posição	Seqüência (5'-3')	Genótipo	Referência bibliográfica
Gene VP7				
(Beg 9)	1-28	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	Comum	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
(End 9 )	1062-1036	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	Comum	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
(EndUK)	1-28	GGTCACATCATACAACTCTAATCT	Comum	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
(EndCRW8)	1062-1036	GGTCACATCTTACAGCTTTAACCT	Comum	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
(FT5)	779-760	CATGTACTCGTTGTTACGTC	G5	Gouvea <i>et al.</i> , 1994a
(DT6)	499-481	CTAGTTCCTTG TAGATC	G6	Gouvea <i>et al.</i> , 1994a
(HT8)	273-256	CGGTTCCGGATTAGACAC	G8	Gouvea <i>et al.</i> , 1994a
(ET10)	714-697	TTCAGCCGTTGCGATTC	G10	Gouvea <i>et al.</i> , 1994a
(BT11)	336-316	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	G11	Gouvea <i>et al.</i> , 1994a
Gene VP4				
(4con3)	11-32	TGGCTTCGCTACTTTATAGACA	Comum	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
(4con2)	868-887	ATTTCCGGACCATITATAACC	Comum	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
(PNCDV)	269-289	CATGTACTCGTTGTTACGTC	P1	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
(PUK)	336-354	CTAGTTCCTTG TAGATC	P5	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
(POSU)	389-412	CGGTTCCGGATTAGACAC	P7	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
(Pgott)	465-487	TTCAGCCGTTGCGATTC	P6	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b
(PB223)	574-594	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	P11	Gouvea <i>et al.</i> , 1994b

### 4.6.3 Análise Eletroforética

Os produtos da amplificação de RT-PCR foram analisados em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X (Trisma, ácido bórico e EDTA) com brometo de etídeo 0.3% (solução 0,1mg/ml). A corrida foi efetuada em cuba eletroforética de 17x 17cm marca Hoefer mod. HE99x com voltagem constante de 80 volts. Para acompanhar a corrida foi usado o marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder. A visualização dos resultados nos géis foi feita no transluminador com luz ultravioleta 254nm.

### 4.7 Análise dos dados

Os dados levantados foram tabulados no programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS for Windows versão 15.0) onde avaliou-se a sensibilidade, especificidade, valor preditivo de um resultado positivo, valor preditivo de um resultado negativo e exatidão com base nos dados descritos por (Ferreira & Ávila, 2001). O teste de EGPA foi utilizado como diagnóstico verdadeiro para ser comparado ao teste de LATEX. Para os testes de correlação foram considerando significantes os resultados com  $p < 0,005$ .

TESTE	Doença-Diagnóstico Verdadeiro	
	Presente	Ausente
Positivo	Verdadeiro positivo (VP)	Falso Positivo (FP)
Negativo	Falso negativo (FN)	Verdadeiro negativo (VN)
Total	VP +FN	FP +VN

**Sensibilidade:** A sensibilidade de um teste sorológico refere-se à porcentagem de resultados positivos pelo teste na população doente. Proporção de resultados verdadeiros positivos.

$$\text{SENSIBILIDADE} = \frac{\text{VP}}{\text{VP}+\text{FN}}$$

**Especificidade:** A especificidade de um teste sorológico é definida pela porcentagem de resultados negativos pelo teste nos indivíduos não doentes, ou seja, a proporção dos verdadeiros negativos.

$$\text{ESPECIFICIDADE} = \frac{\text{VN}}{\text{VN}+\text{FP}}$$

**Valor preditivo de um resultado positivo (VPP):** Pode ser calculado pela proporção de indivíduos doentes entre os resultados positivos obtidos no teste em estudo, portanto refere-se a probabilidade de doença quando o resultado do teste é positivo.

$$\text{VPP} = \frac{\text{VP}}{\text{VP}+\text{FP}}$$

**Valor preditivo de um resultado negativo (VPN):** Pode ser calculado pela proporção de indivíduos não-doentes entre os resultados negativos do teste em estudo, portanto se refere à probabilidade de não-ocorrência de doença quando o resultado do teste é negativo.

$$\text{VPN} = \frac{\text{VN}}{\text{VN}+\text{FN}}$$

**Exatidão :** Pode ser calculado pelo número de verdadeiros positivos mais verdadeiros negativos dividido pelo total

$$\text{EXATIDÃO} = \frac{\text{VP} + \text{VN}}{\text{VN} + \text{FN} + \text{FP} + \text{VN}}$$



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diarréias, em animais neonatos, constituem uma enfermidade mórbida de distribuição mundial. A patologia acarreta graves prejuízos econômicos, envolvendo redução na conversão alimentar, altos custos com medicamento e mortalidade (Kaneene & Hurd, 1990). Com as modificações zootécnicas adotadas para incrementar a produção suinícola, as criações extensivas foram substituídas pelo sistema de confinamento, exigindo a utilização de novas técnicas de manejo que se executadas inadequadamente propiciam a proliferação e a permanência de diversos agentes patogênicos (Dewey *et al.*, 1995; Wittum *et al.*, 1995).

Na relação de agentes virais causadores de gastroenterites, o gênero *Rotavirus* merece destaque mundialmente. No nosso país, já foi relatada a presença de rotavírus em diversas propriedades de criação de bovinos e suínos (Rácz *et al.*, 1988; Bittencourt & Rácz, 1992; Pereira *et al.*, 1993; Cardoso *et al.*, 2003).

Para a identificação do agente etiológico da rotavirose se faz necessário um diagnóstico diferencial, uma vez que os quadros clínicos que envolvem a diarréia podem ser causados por inúmeros outros patógenos. A identificação correta e precoce do agente etiológico, evitando gasto desnecessário com medicamentos e antecipa medidas profiláticas direcionadas. As metodologias atuais de detecção de rotavírus envolvem as partículas, os antígenos ou o RNA virais de material fecal. As principais são: a eletroforese em gel de poliacrilamida, imunofluorescência, microscopia eletrônica, hemaglutinação passiva reversa, ensaios imunoenzimáticos, teste de aglutinação do látex e transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Herring *et al.*, 1982; Pereira *et al.*, 1983; Sanders *et al.*, 1986; Lucchelli *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1993; Gouvea *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1994; Estes, 2001).

No presente trabalho objetivou-se detectar a presença de rotavírus em uma granja pelas metodologias de EGPA e LATEX. O método de EIE foi utilizado como teste confirmatório para as amostras com resultado inconclusivo para os dois primeiros.

## 5.1 Identificação de rotavírus por aglutinação de látex

Neste estudo o kit Rotavírus Latex<sup>®</sup> foi utilizado para detectar a presença de rotavírus em amostras diarréicas de 329 leitões e a metodologia detectou 38 amostras rotavírus positivas e 291 foram consideradas negativas conforme mostrado na tabela 2.

**Tabela 2:** Identificação de rotavírus por Aglutinação de Látex em amostras de fezes diarréicas de suínos coletadas em uma granja em Flores da Cunha entre março de 2007 a 2008 .

<b>Determinação de rotavírus por LATEX</b>					
<b>Ano de coleta</b>	<b>Meses</b>	<b>Nº Amostra mesal</b>	<b>Positivas</b>	<b>Negativas</b>	<b>% Positividade mensal</b>
2007	Março	10	-	10	0,0
2007	Abril	28	4	24	16,7
2007	Maio	19	6	13	46,1
2007	Junho	39	11	28	39,2
2007	Julho	33	7	26	26,9
2007	Agosto	31	6	25	19,3
2007	Setembro	26	1	25	3,8
2007	Outubro	29	-	29	0,0
2007	Novembro	29	-	29	0,0
2007	Dezembro	31	-	31	0,0
2008	Janeiro	20	1	19	5,2
2008	Fevereiro	20	1	19	5,2
2008	Março	19	1	18	5,5
<b>Total</b>		<b>329 (100%)</b>	<b>38 (11,6%)</b>	<b>291 (88,4%)</b>	

O levantamento realizado pela metodologia de aglutinação de látex e confirmado pelo EIE identificou uma positividade de rotavírus de 11.6% no estudo global. Essa incidência viral pode ser considerada semelhante quando relacionadas a outros estudos como de Dewey e colaboradores (2003) ao fazerem um estudo epidemiológico utilizando teste de LATEX no período de 1995 a 1997. O acompanhamento dos rebanhos suínos mostrou que houve índices de positividade para rotavírus A de 4.5% a 13.8%. Contudo, números superiores aos encontrados neste estudo já foram divulgados. A análise de 162 amostras de fezes de leitões, realizadas em Trinidad, por Kaminjolo & Adesiyum, (1994) identificou o rotavírus A em 27.8% das enterites analisadas.

Para outras espécies também é possível se fazer a determinação da presença do rotavírus por LATEX. Al-Yousif *et al.* (2001) estudaram amostras diarréicas bovinas e encontraram 63% de positividade para esse vírus.

Essas pequenas diferenças de índices de positividade podem ser explicadas por se tratar de amostras de geograficamente distantes, vírus circulantes distintos, formas de manejos variadas e de kit de análises de distintas marcas.

## **5.2 Identificação de rotavírus por eletroforese em gel de poliacrilamida**

As mesmas 329 amostras de enterites de leitão, coletas de março de 2007 a março de 2008 e analisadas por LATEX também foram comparativamente avaliadas por EGPA sendo identificadas 26 amostras rotavírus positivas (7.9%) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Determinação de Rotavírus por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida EGPA em amostras de fezes diarréicas de suínos coletadas em uma granja em Flores da Cunha entre março de 2007 a 2008.

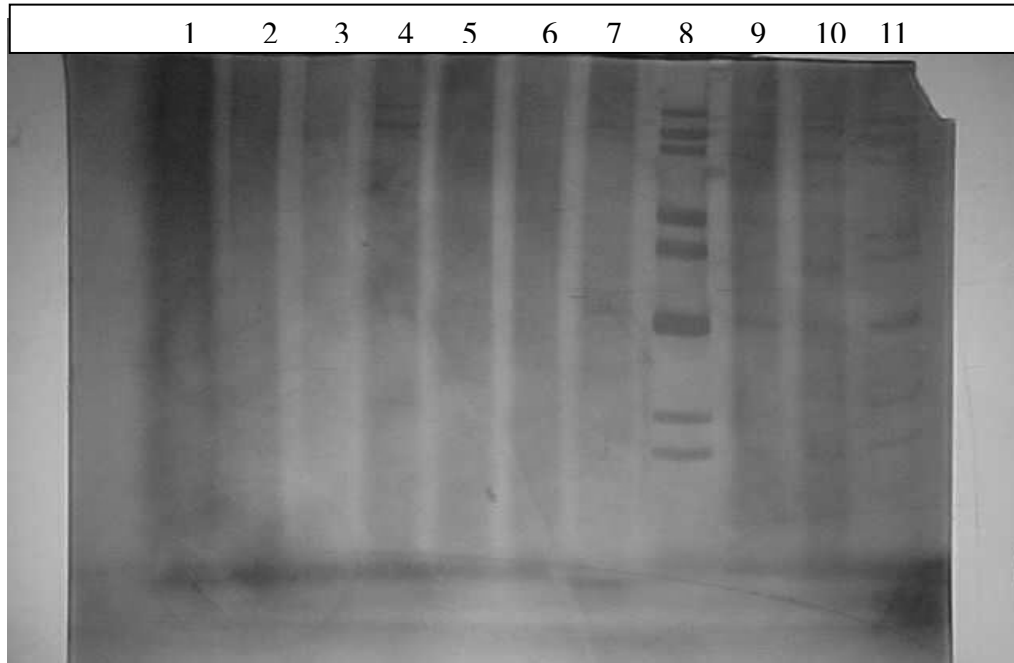
<b>Determinação de rotavírus por EGPA</b>					
<b>Ano de coleta</b>	<b>Meses</b>	<b>Nº Amostra mesal</b>	<b>Positivas</b>	<b>Negativas</b>	<b>% Positividade mensal</b>
2007	Março	10	-	<b>10</b>	0,0
2007	Abril	28	<b>2</b>	<b>26</b>	7,6
2007	Maio	19	<b>6</b>	<b>13</b>	46,1
2007	Junho	39	<b>6</b>	<b>28</b>	21,4
2007	Julho	33	<b>8</b>	<b>25</b>	32
2007	Agosto	31	<b>2</b>	<b>29</b>	6,8
2007	Setembro	26	-	<b>26</b>	0,0
2007	Outubro	29	-	<b>29</b>	0,0
2007	Novembro	29	-	<b>29</b>	0,0
2007	Dezembro	31	-	<b>31</b>	0,0
2008	Janeiro	20	<b>1</b>	<b>19</b>	5,2
2008	Fevereiro	20	-	<b>20</b>	0,0
2008	Março	19	<b>1</b>	<b>18</b>	5,5
<b>Total</b>		<b>329</b> <b>(100%)</b>	<b>26</b> <b>(7,9%)</b>	<b>303</b> <b>(92,1%)</b>	

Os resultados descritos na literatura por Roehle *et al.* (1989) na região sul do Brasil, estudando 231 amostras fecais de suínos de 1 a 60 dias, mostraram uma positividade de 18.6%, uma relação duas vezes maior que no presente estudo, usando como metodologia a técnica de EGPA. Calderaro *et al.* (2001), pesquisaram a frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactantes provenientes de 21 sistemas de produção de suínos no estado de São Paulo, Brasil.

Este estudo, entre os meses março de 1996 a novembro de 1997, através da técnica de EGPA, encontrou uma frequência para rotavírus 10.9%, semelhante à encontrada em nosso estudo.

Em relação ao padrão eletroforético, 100% (26/329) dos rotavírus identificados mostraram um único padrão de migração eletroforética semelhante à linhagem SA11 originária de símio característico do grupo A (4-2-3-2). (Figura 5). Contudo, não foi possível avaliar se houve distinção eletroforética entre os rotavírus de perfil longo. No universo analisado também não se identificou casos com múltipla infecção viral.

A identificação de um único perfil eletroforético não é exclusividade de estudo. Em diferentes estados da Nigéria, a avaliação de 113 amostras de fezes em gel de poliacrilamida mostrou que os rotavírus A positivos pertenciam ao subgrupo 1 e 2 e todos possuíam o mesmo padrão eletroforético (Pereira *et al.*, 1995). O perfil mais comum descrito na literatura é o longo como descrito por alguns autores (Linhares *et al.*, 2000; Arguelles *et al.*, 2000; Coluchi *et al.*, 2002; Ahmed *et al.*, 2006). Em paralelo, para outras espécies, é comum se encontrar variados padrões eletroforéticos de rotavírus como foi descrito por Tamehiro *et al.* (2003) em material fecal de frangos de corte. Relatos de investigação epidemiológica conduzidas na região central do Brasil em crianças mostram a presença de eletroferótipos longos e curtos sendo os primeiros mais prevalentes (91.4%) dos rotavírus (Cardoso *et al.*, 2000).



**Figura 5:** Eletroforese em Gel de poliacrilamida com amostras representativas dos rotavírus em amostras de fecais de suínos coletadas em uma granja em Flores da Cunha entre março de 2007 a 2008 . Canaletas 1, 2, 3, 5, 6, 7: negativas para rotavírus; calenaletas 4, 8, 9 e 10: rotavírus de perfil longo; canaleta 11 controle positivo (SA11) de perfil longo.

A predominância do perfil longo no plantel analisado, indica a alta incidência do rotavírus A. Janke *et al.* (1990) estudando a incidência de rotavírus usando EGPA, em 90 amostras de leitões, encontraram 67.8% de infecções para rotavírus do grupo A, 10% para o grupo B e 11.1% para o grupo C.

Pongsuwanna *et al.* (1996), com 557 amostras de leitões com diarréia na Tailândia por EGPA, identificaram 23 amostras de rotavírus do grupo A, uma do grupo B e duas amostras do grupo C respectivamente. Outro estudo realizado por Will *et al.* (1994) descreve que diarréias em criações comerciais de suínos sejam atribuídas a 89% ao rotavírus do grupo A.

### 5.3 Estudo comparativo entre LATEX e EGPA para detecção do rotavírus em suínos

A técnica de EGPA é uma metodologia relativamente simples, com elevada especificidade quando comparada com microscopia eletrônica e RT-PCR apresentando duas principais vantagens

que são: a detecção de rotavírus não pertencentes ao grupo A e as múltiplas infecções (Herring *et al.*, 1982; Shinozaki *et al.*, 1985; Pacini *et al.*, 1988; Estes, 2001). Outra vantagem desta técnica é a possibilidade de classificar as cepas de rotavírus do grupo A em longo, curto e super-curto permitindo acompanhar os eletroferótipos circulantes no rebanho. Entretanto, as técnicas de LATEX e EIE apresentam uma elevada sensibilidade e especificidade, são amplamente utilizadas nos laboratórios de diagnóstico, porque proporcionam uma rápida detecção dos antígenos rotavírus em um reduzido espaço de tempo (Brandt *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1993; Paul *et al.*, 2006).

Do total de 329 amostras analisadas pelas duas metodologias, 38 amostras foram positivas para LATEX e 26 para EGPA conforme mostra a tabela 4. Vinte amostras (6.1%) foram indeterminadas para LATEX sendo consideradas neste estudo como sendo negativas com base nos resultados confirmados pelo método de EIE. Analisando os dados obtidos pelas duas metodologias através do teste estatístico qui-quadrado, verificou-se que o método LATEX apresentou diferença significativa em relação ao método PAGE.

Vinte e três amostras foram positivas para ambos os testes e 288 foram negativas pelas duas metodologias. Três amostras foram positivas para EGPA e negativas para LATEX, o que não foi detectado pelo kit com a aglutinação por látex. Mas por outro lado, 15 amostras detectadas pelo kit não foram diagnosticadas pelo EGPA. Muito possivelmente, trata-se aqui, da baixa sensibilidade do método eletroforético onde uma reduzida carga viral poderia passar na EGPA

Entre as metodologias avaliadas, a técnica de LATEX mostrou ser a mais sensível quando comparada a EGPA, apresentando uma identificação de rotavírus positiva de 11.6% e 7.9%, respectivamente.

Os resultados obtidos corroboram aos dados descritos na literatura por Altindis *et al.*, (2004), que ao comparar as técnicas de LATEX e EGPA em amostras fecais humanas obteve também uma maior frequência com a técnica de LATEX obtendo 15.5 % e EGPA 11.8% respectivamente. Em outro comparativo realizado por Hammami *et al.* (1990), analisando espécimes diarréicas de bovinos para a pesquisa de rotavírus, obteve um resultado semelhante a este

estudo. A identificação de rotavírus foi de 23% em LATEX e 19% em EGPA.

Os primeiros a descreverem um método de aglutinação em látex para a detecção de rotavírus nas fezes foram Sanekata *et al.* (1981). Desde então foram descritos na literatura diferentes procedimentos de detecção de rotavírus pelo método de aglutinação com partículas de látex propondo uma nova forma de diagnóstico rápido e sem o uso de equipamento (Morinet *et al.*, 1984; Julkunen *et al.*, 1985; Lukowicz *et al.*, 1985; Pai *et al.*, 1985; Miotti *et al.*, 1986; Raj *et al.* 1989).

**Tabela 4.** Comparação dos resultados obtidos na determinação de rotavírus por aglutinação do látex (LATEX) e eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) em amostras de fezes diarréicas de suínos

EGPA			
LATEX	Positivo	Negativo	Total
Positivo	23	15	38
Negativo	3	288	291
Total	26	303	329

Quando o teste aglutinação com partículas de látex foi comparado à eletroforese em gel de poliacrilamida, o primeiro apresentou uma sensibilidade de 88.4%, especificidade de 95%, valor preditivo positivo de 60.5% e um valor preditivo negativo de 99% e uma correlação de 94.5%. O teste de kappa foi de 0,69 apresentado uma correlação significativa entre EGPA e LATEX.

Situação semelhante foi observada com humanos utilizando a técnica de EGPA como referência e o kit de aglutinação em látex Slidex Rotavírus 2® (BioMérieux). Neste caso os autores Ferreira *et al.* (2006) encontraram uma sensibilidade 82.9%, especificidade 98.1%, valor preditivo positivo 96.7%, valor preditivo negativo 89.7%, correlação 92%. Outro estudo realizado Paul *et al.* (2006) ao utilizar a técnica de EGPA como padrão e compará-la a um kit de LAT obteve uma sensibilidade de 70.9% e especificidade de 100%.

Altindis *et al.* (2004) ao estudar fezes de 135 crianças com diarréia obteve 21 casos rotavírus positivo (15.5%) para LATEX e 16 (11.8%) para EGPA, e comparando a eficácia dos testes, obteve



uma sensibilidade 93.7%, especificidade 94.9%, valor preditivo positivo 71.4%, valor preditivo negativo 99.1%, correlação 94.8%.

Chik *et al.* (1985), compararam o teste de Rotalex® (Orion Diagnostics, Finland), um teste comercial de látex para o rotavírus, com a microscopia eletrônica direta e o teste Rotazyme® (Abbott Laboratories, USA), um imunoenensaio enzimático comercial e concluíram que, o teste de Rotalex® teve uma sensibilidade de 81.7%, especificidade de 99.5%, valor preditivo positivo 98% e o valor preditivo negativo foi de 84.9% respectivamente quando comparados com os resultados da microscopia eletrônica direta.

Thomas *et al.* (1994), usaram 434 amostras para avaliar o kit de aglutinação com partículas de látex para detectar o rotavírus denominado (Meritec-Rotavírus®). Os resultados do ensaio em látex foram comparados com microscopia eletrônica. E, os dados levantados mostraram 91 amostras (21%) eram positivas para o rotavírus. A sensibilidade 97%, a especificidade 99%, os valores preditivos positivos 97%, e o valor preditivo negativo foi de 99% .

Brandt *et al.* (1987) sugere que a simplicidade e a especificidade elevada e facilidade dos testes de LATEX, fazem-se uma ferramenta de grande valor quando se faz necessário uma rápida seleção de pacientes sintomáticos. Estes testes exigem poucos minutos em sua execução e apresentam resultados vantajosos sobre outras técnicas mais complexas em sua execução, para estudos de campo e quando a um pequeno número de amostras a serem testadas.

Os testes de aglutinação em látex são muito populares em laboratórios clínicos. Estes já foram aplicados à detecção de mais de 100 doenças infecciosas diferentes, tendo como exemplos recentes: malária, tuberculose, hepatite C e dengue (Molina-Bolivar & Gastisreo-González, 2005).

Testes diagnósticos com sensibilidade e especificidade abaixo de 50% são considerados inadequados, mas se ambas forem 99%, o teste seria considerado modelo (Jeschlke *et al.*, 1994). Sem dúvida, ambas as formas de diagnóstica avaliadas aqui podem atenda os padrões mínimos desejáveis para determinação, resguardada as limitações de cada uma delas.

A metodologia de EGPA é uma técnica de alta especificidade, pois possibilita a além da

determinação do rotavírus também a caracterização do vírus circulante. Outra vantagem desta forma de diagnóstico é a disponibilidade de se avaliar um grande número de amostras simultaneamente, muito útil em casos de surto (Herring *et al.*, 1982; Shinozaki *et al.*, 1985; Pacini *et al.*, 1988). Entretanto, essa técnica exige grande demanda de tempo, equipamentos específicos e profissionais treinados.

A maioria dos kits disponíveis no mercado para detecção de rotavírus é projetado primeiramente para seres humanos e não uso veterinário (Al- Yousif *et al.*, 2001). Portanto, os resultados apresentados neste trabalho indicam a aplicação de LATEX como ferramenta para diagnóstico de rotavírus em leitões. Além disso, pode ser utilizado nas próprias fazendas de criação de manejo intensivo ou proprietários cooperativados.

#### **5.4 Resultados obtidos com a técnica de EIE**

O kit RIDASCREEN<sup>®</sup> Rotavírus foi utilizado neste estudo para confirmação dos resultados obtidos com a técnica de LATEX. Do total analisado por EIE a incidência obtida de espécimes rotavírus positiva foi de 41 (19.8%). Porém Rácz *et al.* (2000) ao utilizar um kit EIE, de outro fabricante, encontrou uma positividade de 35.5% das amostras testadas para rotavírus em suíno. Altindis *et al.*, (2004), detectaram a presença de rotavírus pela técnica de EIE em amostras fecais humanas obteve também uma frequência de 12.5%.

Em relação ao EGPA a técnica de EIE mostrou ser mais sensível. Este resultado corrobora aos dados descritos por Pacini *et al.* (1988) que atribui a um menor limiar de detecção do EIE, para o qual uma pequena quantidade de partículas virais já seria suficiente para a formação do sinal de reação. Além disso, outros fatores, tais como sucessivas alterações de temperatura durante a manipulação das amostras, podem contribuir para o desaparecimento de bandeamento característico do EGPA pela perda do dsRNA, mantendo contudo, preservada a proteína viral VP6, o que

possibilita o diagnóstico imunoenzimático

### 5.5 Resultados obtidos da genotipagem viral

A técnica de RT-PCR tem sido amplamente utilizada para a caracterização de genótipos G e P de rotavírus a partir de RNA extraído de fezes ou também de cultivo celular. Essa metodologia mostrou possuir alta sensibilidade na detecção de amostras de certos genótipos em relação às técnicas convencionais de sorotipagem (Nakagomi *et al.*, 1991).

Subseqüente à triagem das 329 amostras feitas pelas técnicas de PAGE e LATEX, 26 foram selecionadas para a genotipagem, porém três destas foram insuficientes e não foram genotipadas restando 23 amostras. Os resultados obtidos das amostras genotipadas estão apresentados na tabela 6.

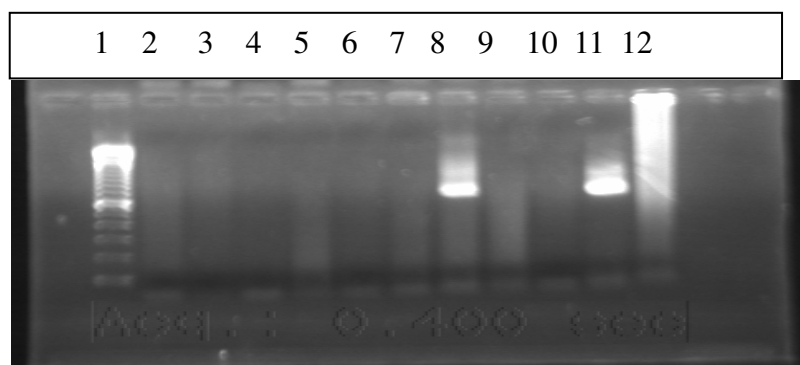
**Tabela 5.** Número de amostras identificadas com cada genótipo considerados isoladamente, através da técnica de semi-nested RT-PCR nas amostras de rotavírus identificadas na granja de Flores da Cunha, entre 2007 e 2008.

---

<b>Número total de amostras caracterizadas <i>Genótipo G</i></b>			
	<b>Único</b>	<b>Mistura</b>	<b>Total</b>
<b>G5</b>	2	-	2
<b>G6</b>	-	-	-
<b>G8</b>	-	-	-
<b>G10</b>	-	-	-
<b>G11</b>	-	-	-
<b>GNEG</b>	21	-	23

---

Dos genótipos encontrados para o gene da proteína VP7 do rotavírus, o único genótipo positivo para os primers testados foi o G5 com produto de 742 pb conforme mostrado na figura 6.



**Figura 6.** Análise por eletroforese em gel de agarose 2.5 % com brometo de etídeo, dos produtos amplificados por RT-PCR de rotavírus provenientes de amostras fecais suínas para determinação dos genótipos G. Canaleta 1: marcador de tamanho molecular (Invitrogen®, EUA); canaleta 8 e 11: Produto consensual para genótipo G5 (742 pb); canaletas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10 amostras negativas para os primers estudados.

Os resultados obtidos com a genotipagem viral para o gene da proteína VP7 corroboram a os achados descritos na literatura. O genótipo G5 de rotavírus é predominantemente em suínos tem sido descrito em vários países, tais como, Colômbia (Solarte *et al.*, 1999), Estados Unidos (Rosen *et al.*, 1994), Venezuela e Argentina (Ciarlet *et al.*, 1995 citados por Pongsuwaana *et al.*, 1996). No Brasil, G5 aparece relacionado a infecções em humanos e suínos, reforçando a hipótese de que o reagrupamento genômico interespecies ocorra naturalmente (Gouvea & Brandtly, 1995). O fato que os genótipos G6, G8, G10 e G11 descritos para genótipos suínos por Gouvea *et al.* (1994a) não serem positivos para as amostras estudadas, se deve ao fato até o momento já foi isolado. Isso poderia ser explicado pelo isolamento do rebanho que por se tratar de uma granja que produz produtos para a exportação segue rígidas exigências de sanidade animal internacionais.

Já foram isolados 16 genótipos G de humanos e animais, dez destes isolados em humanos com predominância de G1-G4, e para suínos os mais comuns isolados foram G3, G4, G5 e G11 (Estes, 2001, Gulati *et al.*, 2007). Há um número limitado de estudos em relação a prevalência e a distribuição dos sorotipos e genótipos de rotavírus suínos, mas já foram isolados os genótipos G1, G3, G4, G9, G10 e G11 de amostras fecias suínas.

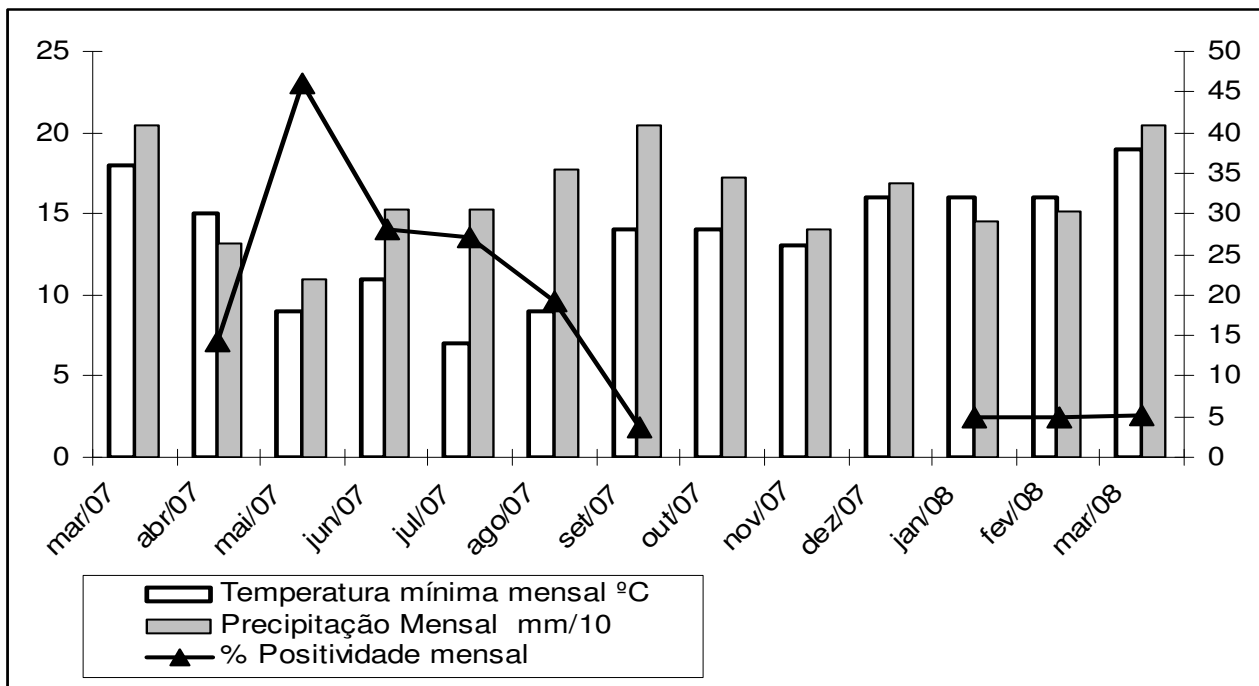
O sorotipo G1 que é caracteristicamente humano, apresentando-se amplamente distribuído em todo o mundo, mas também já foi descrito em suínos no Brasil (Santos *et al.*, 1999). A mistura

G1-G5 foi observada por Santos *et al.* (1999) em um estudo desenvolvido no Brasil com amostras provenientes do Paraná, onde, de 10 amostras analisadas, uma demonstrou o caso de infecção mista em suínos, entretanto, não foi possível relacionar o surgimento de banda extra a um padrão eletroforético diferente de 4-2-3-2 observado no grupo A de rotavírus.

O fato de diarreias serem relativamente comuns entre leitões faz com que muitos produtores não notifiquem seu aparecimento, a menos que muitos animais venham a óbito, os gastos com tratamento veterinário sejam altos ou que o retardo no crescimento do animal seja acentuado (Solarte *et al.*, 1999), o que termina por comprometer os estudos relacionados à ecobiologia do vírus.

### **5.6 Resultados obtidos do padrão sazonal nesta granja**

Em geral rotavírus mostram um padrão sazonal de infecção de picos epidêmicos ocorrendo nos meses mais frios do ano (Kapikian & Chanock, 1996). Ela ocorre, predominantemente, no inverno em regiões de clima temperado e durante todo o ano em áreas de clima tropical (Tiemessen *et al.*, 1989; Bresee *et al.*, 1999). No Brasil, as regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste apresentam pico predominante nos meses secos, de maio a setembro (Coiro *et al.*, 1985; Gomes *et al.*, 1991; Cardoso *et al.*, 1992; Cardoso *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2004), ao contrário das regiões Norte e Nordeste, onde a sazonalidade não é tão marcante e se mantém em torno de 20% durante todo o ano (Linhares *et al.*, 1989; Stewien *et al.* 1991; Pereira *et al.*, 1993).



**Figura 7:** Sazonalidade do rotavírus em amostras de fezes de suínos coletadas em uma granja em Flores da Cunha diagnosticadas por LATEX e EGPA no período de 2007 e 2008.

Os dados obtidos do padrão sazonal nesta granja estão de acordo com os dados descritos na literatura, pois o maior pico de incidência do rotavírus ocorreu nos meses mais frios mostrando um pico de maior incidência do rotavírus (Kapikian & Chanock, 1996) Figura 7. É importante destacar que as gastroenterites estiveram presentes durante todos os meses do ano, mas o agente etiológico em questão não foi identificado nos meses de março, setembro, outubro, novembro e dezembro testados por duas metodologias tabela 2 e 3.

## 6. CONCLUSÕES

1. A frequência de rotavírus na granja estudada, no período de março de 2007 a março de 2008 foi de 11.6% avaliada pela técnica de aglutinação em látex.
2. A frequência de rotavírus na granja estudada no período de março de 2007 a março de 2008 foi de 7.9% avaliadas pela metodologia de eletroforese em gel de poliacrilamida.
3. A metodologia de aglutinação com partículas de látex mostrou ser mais sensível que a de eletroforese em gel de poliacrilamida detectando um maior número de amostras rotavírus positivas.
4. A caracterização molecular por RT-PCR das amostras rotavírus positivas selecionadas para serem genotipadas identificaram apenas o G5 para os primers estudados.
5. Não foram identificadas amostras com misturas de genótipos ou infecções múltiplas.
6. Foi possível observar a sazonalidade do rotavírus nesta fazenda com pico de incidência entre os meses mais frios do ano.
7. O kit de aglutinação de látex desenvolvido para fezes humanas mostrou ser de grande importância para aplicação de diagnóstico de rotavírus em fezes de suínos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABIPECS-Associação Brasileira de Indústrias Processadoras e Exportadoras de Carne Suína(2008).Relatorioanual2007,SãoPaulo. **Disponível(online)** <http://www.abipecs.org.br> (09/06/2008).
- ACSURS- Associação de criadores de suíno no Rio Grande do Sul (2008). **Disponível (on line)** <http://www.acsurs.com.br> (09/06/2008)
- Adah, M.I.; Wade, A.; Oseto, M.; Kuzuya, M.; Taniguchi, K.(2002).Detection of human group C rotaviruses in Nigeria and sequece analysis of their genes encoding VP4, VP6 and VP7 proteins. **J. Med. Virol.**66:269-275.
- Ahmed, H. H.; Coulter, J. B.; Nakagomi, O.; Hart, C.A.; Zaki, J.M.; Al-Rabaty, A. A.; Dove, W.; Cunliffe, N.A.(2006) Molecular characterization of rotavirus gastroenteritis strains, Iraqi Kurdiastan. **Emerg Infect Dis.**12(5):824-6
- Aitken, C.; Jeffries, D. J.(2001) Nosocomial spread of viral disease.**Clin. Microbiol. Rev.** ;14(3):528-546
- Alfieri, A. A.; Resende, M.; Conti, L. E.; Alfieri, A. F.(1991) Evidências do desenvolvimento do rotavírus nas diarréias do pré e pós-desmame dos suínos.**Arq. Brás. Méd. Vet. Zoot.**,43 (4): 291-300



- Altindis, M.; Yavru, S.; Simsek, A.; Ozkul, A.; Ceri, A.; Hasan, K.O.C. (2004) .Rotavirus infection in children with acute diarrhea as detected by latex agglutination, ELISA and Polyacrylamide Gel Electrophoresis **.Indian Pediatrics** 41:590-594
- Al-Yousif Y.; Anderson, J.; Chard-Bergstrom, C.; Bustamante, A.; Muenzenberger M.; Austin K.; Kapil, S.(2001) Evaluation of a latex agglutination kit (Virogen Rotatest) for detection of bovine rotavirus in fecal samples. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** ; 8: 496-8.
- Aponte, C.; Poncet D.; Cohen, J. (1996). Recovery and characterization of a replicase complex in rotavirus-infected cells by using a monoclonal antibody against NSP2. **J .Virol.** 70: 985-991.
- Arguelles, M. H.; Villegas, G.A.; Castello, A.; Abrami, A.; Ghiringhelli, P.D.; Semorile, L.; Glikmann, G.(2000) VP7 and VP4 genotyping of human group A rotavirus in Buenos Aires, Argentina. **J. Clin. Microbiol.** 38(1):252-9
- Ball, J. M.; Tian, P.; Zeng, C. Q.; Morris, A. P.; Estes, M.K. (1996)Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science.**272(5258):101-104.
- Barro, M.; Patton, J.T. (2005) Rotaviruses nonstructural protein 1 subverts innate immune response by inducing degradation of inf regulaory factor 3. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.**;102(11):4114-9.
- Bass, D.M.; Mackow, E.R.; Greenberg, H.B. (1990) NS35 and not VP7 is the soluble rotavirus protein which binds to target cells. **J. Virol.** 64: 322-330.

- Bernstein, D.I.; Sack, D.A.; Rothstein, E.; Reisinger, K.; Smith, V.E.; O'sullivan D.; Springgs, D.R.; Ward., R.L.(1999) Efficacy of live, attenuated, human rotavirus vaccine 89-12 in infants: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet.** ;354(9175):287-90.
- Berrios, P.; Pinochet, L.; Abalos, P.; Cuevas, L.(1989) Presencia de rotavirus en cerdos lactentes com síndrome diarreico. **Avances en Ciências Veterinarias**, v.4, p. 160-163
- Bishop, R.F.; Davidson, G.P.; Holmes, I.H.; Ruck, B.J. (1973) Vírus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet.**;2(7841):1281-3.
- Bittencourt, M.J.; Rácz, M. L. (1992) Eletrophoretic study of the genome of porcine rotavirus from São Paulo , Brazil **Rev. Microbiol.**,(23)..2; 149-151
- Bittencourt, M. J.; Cadeias, J. A. N. (1986)Study of rotavirus by poliacylamide gel electrophoresis (EGPA) and enzyme immunoassay. In:Encontro Nacional de Virologia,3.São Lourenço, M.G. **Resumos.**Rio de Janeiro : Centro Panamericano de Febre Aftosa(OPAS/OMS), p.34.
- Blackhall, J.; Muñoz, M.; Fuentes, A.; Magnusson, G. (1998) Analysis of rotavirus nonstructural protein NSP5 phosphorylation. **J .Virol.** 72:6398-6405.
- Blacklow, N. R., Greenberg, H. B.(1991) Viral gastroenteritis. **N. Engl. J. Med.** . Boston, 325, (4):252 -264.

- Borchardt, M.A.; Bertz, P.D.; Spencer, S.K.; Battigelli, D.A.(2003) Incidence of enteric viruses in groundwater from household wells in Wisconsin. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 1172-1180.
- Brandt, C.D.; Kim, H.W.; Rodriguea, W.J.; Thomas, L.; Yolken, R.H.; Arrobio, J.O.; Kapikian A.Z.; Parrott, R.H.; Chanock, R.M.(1981). Comparison of direct electron microscopy , immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. **J. Clin. Microbiol.**;13(5):976-981.
- Brandt, C.D.I.; Arndt, C.; Evans, G.; Kim, H.W.; Stallings, E.P.; Rodriguez, W.J.; Parrott, R.H.(1987) evaluation of a latex test for rotavirus detection. **J Clin Microbiol.** 25: 1800-1802.
- Bresee, J.S.; Glass, R.I.; Ivanoff, B.; Gentsch, J.R.(1999) Current status and future priorities for rotavirus vaccine development, evaluation and implementation in developing countries. **Vaccine** 17:2201-2222
- Bresee, J.S.; Parashar, U.D.; Widdowson, M.A.; Gentsch, J.R.; Steele, A. D.; Glass, R.I.(2005) Update on rotavirus vaccines **Pediatr. Infect. Dis. J.**;24(11):047-952
- Calderaro, F.F.; Baccaro, M.R.; Moreno, A.M.; Ferreira, A.J.P; Jerez, A.J; Pena H.J.F. (2001) Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactantes provenientes de sistemas de produção de suínos do estado de São Paulo.**Arq. Inst. Biol.**, (68):.1, .29-34
- Cardoso, D.D.; Martins, R.M.; Kitajima, E.W.; Barbosa, A.J.; Camarota, S.C.; Azevedo, M.S.(1992). Rotavirus e adenovirus em crianças de 0-5 anos hospitalizadas com ou sem

gastroenterite em goiânia-GO, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo.(34)5, 433-439.

Cardoso, D.D.P.; Soares, C.M.A.; Azevedo, M.S.P.; Leite, J.P.G.; Munford, V.; Racz, M.L.(2000) Serotypes and subgroups of rotavirus isolated from children in Central Brazil. **J. Health. Popul. Nutr.** 18:39-43.

Cardoso, D.D.; Soares, C.M.; Dias e Souza M.B.; De Azevedo. M.S.; Martins, R.M.; Queiroz, D.A..(2003) Epidemiological features of rotavirus infection in Goiania, Goias, Brazil, from 1986 to 2000. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro.;98(1):25-9.

Chen, D.; Zeng, C.Q.; Wentz, M.J.; Gorziglia, M.; Estes, M.K.; Ramig, R. (1994) Template-dependent , in vitro replication of rotaviruses RNA. **J.Virol**; 68(11):7030-7039.

Chik, H.P.; Shahrabadi, W.M.S.; Ince, B.(1985) Diagnosis of Rotavirus Gastroenteritis by a Commercial Latex Agglutination Test. **J. Clin. Microbiol.** 22: 846-850.

Ciarlet, M.; Crawford, S.E.; Cheng, E.; Blutt, S.E.; Rice, D.A.; Bergelson, J.M.; Estes M.K.(2002). VLA-2 ( $\alpha 2\beta 1$ ) Integrin promotes rotavirus entry into cells but is not necessary for rotavirus attachment. **J. Virol.** 76:1109-1123.

Clark, H.F.; Offit, P.A.; Ellis, R.W.; Eiden, J.J.; Krah, D.; Shaw.A.R.,Pichichero M.; Treanor, J.J.; Borian, F.E.; Bell, L.M.; Plokin, S.A.(1996). The development of multivalent bovine rotavirus (strain WC3) reassortant vaccine for infants. **J. Infect. Dis.** 174 Suppl 1:73-80.

Coiro, J.R.R.; de Almeida-Neto A,J.; Heuser, M.C.F.; Bendati, M.M.A.; Vasconcelos, V.L.(1985) Acute enteritis associated with rotavirus presence in brazilian children: evaluations on the prevalence, therapy and age group. **J. Diarrhoeal. Dis. Res.** 3:78-83

Collins, J.; Benfeld, D.; Duimstra, J. (1989) Comparative virulence of two porcine group A rotaviruses isolates in gnotobiotic pigs. **Am. j. Vet. Res.** Chicago. v. 50; 827-835

Coluchi, N.; Munford, V.; Manzur, J.; Vazquez, C.; Escobar, M.; Weber, E.; Mármol, P.; Rácz, M. L.; (2002) Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of Rotavirus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. **J. Clin. Microbiol.** 40(5):1709-14

Corrêa, S.; Rigo, L.; Rosa, G.R.; Reetz, E.; Vencato, A.; Beling, R. R. (2007). **Anuário brasileiro de aves e suínos 2006** .Santa Cruz do Sul:Ed. Gazeta de Santa Cruz. 136p.

Costa, P.S.S.; Grisi, S.J.F.E.; Cardoso, D.D.P.; Fiaccadori, F.S.; Souza, M.B.L.D.; Santos, R.A.T. (2004) Manifestações clínicas e epidemiológicas das infecções por *Rotavirus A*. **Pediatria** 26:151-158.

Das, B.K.; Gentsch, J.R.; Cicirello, H.G.; Woods, P.A.; Ramachandran, M.; Gupta A. (1994) Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **J. Clin. Microbiol.** 32(7):1820-1822.

Dewey, C.E.; Wittum, T.E.; Hurd, H.S.; Dargatz, D.A.; Hill, G.W., 1995. Herd and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 4-14 days of age. **Swine Health Prod.**, 3; 21-28.

Dewey, C.; Carman, S.; Pasma, T.; Josephson, G.; McEwen, B. (2003) Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario **Can. Vet. J.** 44:649-653

Driesen, S.J.; Carland, P.G.; Fahy, V.A (1993) Studies on preweaning piglet diarrhoea. **Aust. Vet. J.**70(7):259-62.

Durigon, E.L.; Candeias, J.A.; Jerez, J.A.; Bittencourt, M.J.; Ortolani, E.L.(1991). Comparison of staphylococcal co-agglutination with other assays for rapid diagnosis of rotavirus infection in humans, calves and piglets. **J. Virol. Methods.**;35(1):73-9.

Eichwald, C.; Vascotto, F.; Fabbretti, E.; Burrone, O.R. (2002). Rotavirus NSP5: mapping phosphorylation sites and kinase activation and viroplasm localization domains. **J. Virol.** 76:3461-3470.

El-Assouli, S.M. (1996) Inter-relationships among subgroups, serotypes and electrophoretotypes of rotavirus isolated from humans. **J. Diarrhoeal Dis. Res.**, Bangladesh, 14(3); .201-206.

Ellens, M.J.; Leeuw, P.W.; Straver, R.j.; Van Balken, J.A.M.(1978) Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigen in calf faeces. **Med. Microbiol. Immunol.**166:157-163

Estes, M.K.; Cohen J.(1989) Rotavirus gene structure and function. **Microbiol. Rev.** 53:410-449.

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

Estes, M. K.; Kapikian, A. Z.(2007) Rotaviruses In: **Fields Virology**, edited by D. M. Knipe and

P. M. Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.1917-1974.

Falconer, M.M.; Gilbert. J.M.; Roper, A.M.; Greenberg H.B.; Gavora, J.S.(1995) Rotavirus-induced fusion from without in tissue culture cells. **J. Virol.** 69:5582-5591.

Flewett, T.H.; Bryden, A.S.; Davies, H.(1973) Vírus particles in gastroenteritis. **Lancet** . 2(7844):1497.

Flewett, T. H.; Bryden, A. S.; Dies, H.; Woode, G. N.; Bridger, J. C.; Derrick, J. M.(1974) Relation between víruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves.**Lancet.** 2: 61-3.

Ferreira, T. L.; Becho, M. C.; Bernardo, A. R.; Chaves, T. C. B; Ribeiro, R. S; Lima, J. S.; Fialho, A. M.; Leite, J.P.G; Mazur, C.; Danelli, M. G. M.(2006) Performance of latex agglutination test in the diagnosis of acute gastroenteritis by rotavirus **Brazilian Journal of Microbiology** . 37:,587-589

Fouquet, C. M.; Mayo, M.A.; Maniloff; J.; Desselberger, U.; Ball, L. A. (2007) Vírus taxonomy. **Eighth report of the international Committee on Taxonomy of Víruses.**, San Diego, CA: Academic Press,. p.447-496.

Frost, F.J.; Kunde. T.R.; Craun. G.F.(2002) Is contaminated groundwater an important cause of viral gastroenteritis in the United States? **J. Environ. Health** .65: 9-14.

Fujii, R.; Kuzuya. M.; Hamano, M.; Yamada, M.; Yamazaki, S.(1992).Detection of Human Group C Rotaviruses by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Monoclonal Antibodies **J. Clin. Microbiol**;30(5):1307-1311

Gabbay, Y.B.; Morais, M.A.A.; Alves, A.S; Oliveira, K.K.; Mascarenhas, J.D.P.; Linhares, AC.(2005)Detecção de rotavirus por imunocromatografia: ensaio simples e de rápida execução. **Rev. Par Méd.**19(1):13-18.

Gault, E.; Chikhi-Brachet, R.; Delon, S.; Schinepf, N.; Albiges, L.; Grimprel, E.; Girardet, J. F.; Begue, P.; Garbarg-Chenon, A.(1999).Distribuiton of human rotavirus G types circulating in Paris, France, during the 1997-1998 epidemic high prevalence of types G4.**J. Clin. Microbiol.** 37:2373-2375

Gatti, M.S.V. (1988) Incidência de rotavirus em suínos na região de Campinas, São Paulo.**Rev. Microbiol.** 19:327-332

Gatti, M. S. V.; Hara, N.H.; Ferraz, M. M. G.; Woode, G. N.; Bridger, J. C.; Derrick, J. M.(1989) Presence of group A and non-A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, São Paulo, Brazil. **Med. Microbiol. Immunol.**178: 347-9.

Gentsch, J;R.; Glass, R.I.; Woods, P.; Gouvea, V.; Gorziglia, M.; Flores, J.; Das, B.K.; Bhan, M.K., (1992) Identification of group A rotavirus gene 4 types by Polymerase Chain Reaction. **J. Clin. Microbiol.** 30(6):1365-1373.

Gentsch, JR; Woods, P.A.; Ramacuandran, M.; Das, B.K.; Leite, J.P.; Alfieri, A.; Kumar, R.; Bhan, M.K.; Glass, RI. (1996) Review of G and P typing results from a global collection of rotavirus strains: implications for vaccine development. **J. Infect. Dis.** 174:30-36.



Gentsch, J.R.; Laird, A.R., Bielfelt, B., Griffin, D.D., Banyai, K., Ramachandran M., Jain, V., Cunliffe, N.A.; Nakagomi, O.; Kirkwood, C.D.; Fischer, T.,K.; Parashar, U.D.; Bresee, J.S.; Jiang, B.; Glass, R.I.(2005) Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. **J. Infect. Dis.** ;192(Suppl. 1):S146-59.

Glass, R.I.; Parashar, U.D.; Bresee, J.S.; Turcios, R.; Fischer, T.K.; Widdowson, M.A.; Jiang, B.;Gentsch,J.R.(2006) Rotavirus vaccines: current prospects and future challenges **.Lancet** .368(9532):323-332.

Gofti-Laroche, L.; Gratacap-Cavallier, B.; Genoulaz, O.; Joret, J.C.; Harteman, Ph., Seigneurin, J.M.; Zmirou, D.(2001) A new analytical tool to assess health risks associated with the virological quality of drinking water (EMIRA study). **Water Sci. Technol.** 43: 39-48

Gombold, J.L.; Ramig, R. F. (1994) Genetics of the rotaviruses. In: Ramig, R.F. (eds).**Rotaviruses** . Berlin: Springer-Verlag. p 130-137.

Gomes,T.A.; Rassi, V.; McDonald, K.L.; Ramos, S.R.T.S.; Trabulsi, L.R.; Vieira, M.A.; Guth, B.E.C.; Candeias, J.A.N.; Ivey, C.; Toledo, M.; Blake, P. (1991)Enteropatogens associated with acute diarrheal diseases in urban infants in São Paulo, Brazil. **J. Infect. Dis.** 164:331-337.

González, R.A.; Torres-Vega M.A.; López, S.; Arias, C.F. (1998) In vivo interactions among rotavirus nonstructural proteins. **Arch. Virol.** 143:981-996

Gouvea, V., Glass, R.I.; Woods, P.; Taniguchi, K.; Clark, F.H.; Forrester, B.; Fang, Z. Y.(1990)

Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.**;28(2):276-282.

Gouvêa, V.; Santos, N.; Timenetsky, M.C. (1994a) Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **J. Clin. Microbiol**, 32 (5): 1338- 1340.

Gouvêa, V.; Santos, N.; Timenetsky, M.C. (1994b) VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **J. Clin. Microbiol**, 32 (5): 1333-1337.

Gouvea, V; Brandtly, M.(1995) Is rotavirus a population of reassortants? **Trends Microbiol**.3:159–162.

Guerrero. C.A.; Mendez, E.; Zarate. S., Isa P.; Lopez S., Arias C.F.(2000).Integrin alpha(v)beta(3) mediates rotavirus cell entry. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**;19;97(26):14644- 146449.

Gulati, B.R.; Deepa, R.; Singh, B. K.; Rao, C. D. (2007)Diversity in indian equine rotaviruses: Identification of genotype G10,P6[1] and G1 strains and a new VP7 genotype( G16) strain in specimens from diarrheic foals in India. **J. Clin. Microbiol**. 45(3): 972-978.

Gurwith, M.; Wenman, W.; Hinde, D.; Feltham, S.; Greenberg, H. (1981). A prospective study of rotavirus infection in infants and young children. **J. Infect. Dis.**; 144(3):218-224

Hammami, S.; Castro, A. E.; Osburn, B. I(1990) Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis, an enzyme-linked-immunosorbent assay, and an agglutination test for the direct identification of bovine rotavirus from feces and coelectrophoresis of viral RNA's **J.**

Halaihel, N.; Lievin, V.; Ball, J.M.; Estes, M.K. (2000) Alvarado F, Vasseur M. Direct inhibitory effect of rotavirus NSP4(114-135) peptide on the Na(+)-D-glucose symporter of rabbit intestinal brush border membrane. **J.Virol.** 74:9464-9470.

Herring, A. J., N. F. Inglis, C. K. Ojeh, D. R. Snodgrass, and J. D. Menzies. (1982) Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **J. Clin. Microbiol.** 16:473-477.

Hewish, M.J.; Takada, Y.; Coulson, B.S. (2000) Integrins alpha2beta1 and alpha4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. **J. Virol.** ;74(1):228-36.

Ho, M.S.; Glass, R.I.; Pinsky, P.F.; Anderson, L.J.(1988) Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States. **J. Infect. Dis.** 158:1112-1116.

Inouye, S.; Yamashita, K.; Yamadera, S.; Yoshikawa, M.; Kato, N.; Okabe, N.(2000) Surveillance of viral gastroenteritis in Japan: pediatric cases and outbreak incidents. **J. Infect. Dis.** 181:270-274.

INTERVET/Schering-Plough Animal Health- Caracteristica da vacina porcilis(2008)

[http://www.intervet.com.br/products/porcilis\\_\\_2\\_4\\_3/010\\_caracter\\_sti\\_cas.asp](http://www.intervet.com.br/products/porcilis__2_4_3/010_caracter_sti_cas.asp) ;

[http://www.intervet.com.br/products/PORCILIS\\_\\_2\\_4\\_3/020\\_Resumo\\_da\\_Bula.asp](http://www.intervet.com.br/products/PORCILIS__2_4_3/020_Resumo_da_Bula.asp)

acesso (09/09/2008) **Disponível(online)**

Janke, B. H.; Nelson, J. K.; Benfield, D. A.; Nelson, E. A.(1990) Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds **J. Vet.**

**Diagn. Invest.** 2:308-311

Jaeschke, R; Guyatt, G.H.; Sackett, D.L.(1994). Users' guides to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? The Evidence-Based Medicine Working Group. **JAMA.** 2;271(9):703-7

Jourdan, N.; Brunet, J. P.; Sapin, C.; Blais, A.; Cotte-Laffitte, J.; Forestir, F.; Quero, A.M.;

Trugnan, G.; Servin, A.L.(1998) Rotavirus infection reduces sucrase-isomaltase expression in human intestinal epithelial cells by perturbing protein targeting and organization of microvillar cytoskeleton.**J. Virol.**; v.72,p.7228-7236

Julkunen, I.; Savolainen, J.; Hautanen, A.; Hovi, T.(1985) Detection of rotavirus in faecal specimens by enzyme immunoassay, latex agglutination and electron microscopy. **Scand J. Infect Dis.** 17: 245-9.

Kaminjolo, J. S.; Adesivun A. A. (1994) Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. **Br. Vet J.** ; 150(3):293-9.

Kaneene, J.B.; Hurd, H.S.(1990) The national animal health monitoring system in Michigan.III- Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine.**8(1),127-40

- Kang, G.; Iturriza-Gomara, M.; Wheeler, J.G.; Crystal, P.; Monica, B.; Ramani, S.(2004) Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription- polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in South India. **J. Med. Virol.**;73(1):118-122.
- Kapikian, A. Z.; Chanock, R. M.(1996) Rotaviruses. In: FIELDS, B.N. **Fields Virology**, 3<sup>rd</sup>.ed., vol. 2, New York: Raven Press. p.1657-1708.
- Kapikian, A.Z.; Hoshino, Y.; Chanock, R.M.; Perez-Schael.(1996) Efficacy of a quadrivalent rhesus rotavirus-based human rotavirus vaccine aimed at preventing severe rotavirus diarrhea in infants and young children.**J. Infect. Dis**;174 (1):65-72.
- Kapikian, A.Z.; Hoshino, Y.; Chanock, R.M.; (2001) Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, editors. **Fields Virology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;1787-833.
- Katsuda, K.; Kohmoto, M.; Kawashima, K.; Tsunemitsu, H. (2006).Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. **J. Vet. Diagn. Invest.** 18:350–354
- Kim, Y.; Chang, K.O.; Straw, B.; Saif, L.J. (1999) Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. . **J. Clin. Microbiol**, 37 (5): 1484-1488.
- Krishnan, T.; Burke, B.; Shen, S.; Naik, T.N.; Desselberger, U. (1994) Molecular epidemiology of human rotaviruses in Manipur: Genome analysis of rotaviruses of long electropherotype and subgroup I. **Arch. Virol.** 134:279-292.

Kroeff, S.S.(1999). Caracterização sorológica e molecular de rotavirus de suínos na região sul do Brasil. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias , Curitiba, Brazil.

Landaeta, M.E.; Dove, W.; Vinh, H.; Cunliffe, N.A.; Campbell, J.; Parry, C.M.; Farraa, J.J.; Hart, C.A.(2003) Characterization of rotavirus causing diarrhoea in vietnamese children. **Ann.Trop. Parasitol.**79:53-59

Lecce, J. G; King, M. W. (1978). Role of Rotavirus (Reo-Like) in Weanling Diarrhea of Pigs. **J. Clin. Microbiol.**(8)4:454-458

Leite, J.PG; Alfieri, A.A.; Woods, P.A.; Glass, R.I.; Gentsch, J.R.(1996) Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Arch. Virol.** ;141(12):2365-2374.

Linhares, A.C.; Pinheiro, F.P.; Schmetz, C.; Muller, G; Petters, D. (1977). Duovírus (rotavirus) em Belém, Pará. **Rev Inst Med Trop São Paulo.**;19(4):278-9.

Linhares, A.C.; Pinheiro, F. P.; Freitas, R.B.; Gabbay, Y.B.; Shirley, J.A.; Beards G.M.(1981) An outbreak of rotavirus diarrhea among a nonimmune, isolated South American Indian community. **Am. J. Epidemiol**; 113(6):703-710

Linhares, A.C.; Gabbay, Y.B.; Freitas, R.B.; Travassos da Rosa ,E.S.; Mascarenhas, J.D.P.; Loureiro, E.C.B.(1989) Longitudinal study of rotavirus infections among children from Belém, Brazil. **Epidemiol Infect** 102:129-145.

Linhares, A.C.(2000) Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for its control.

**Cad Saude Publica.**16(3):629-46.

Liprandi, F.; García, D.; Botero, L.; Gorziglia, M.; Cavazza, M.E.; Pérez-Schael, I.; Esparza, J.(1987) Characterization of rotaviruses isolated from pigs with diarrhoea in Venezuela

**Vet Microbiol.** 13 (1) :35-45.

Lopez, S.; Arias, C.F.(2004) Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance.**Trends. Microbiol.** ;12(6):271-278.

Lopman. B.A.; Reacher, M.H.; Van Duijnhoven, Y.; Hanon, F.X.; Brown, D.; Koopmans, M.(2003) Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. **Emerg Infect Dis** 9: 90-96.

Ludert, I.E.; Krishnaney, A.A.; Burns , J.W.; Vo, P.T.; Greenberg, H.B.(1996) Cleavage of rotavirus VP4 in vivo. **J. Gen. Virol.** 77:391-395.

Lundgren, O.; Svesson, L(2001). Pathogenesis of *Rotavirus* diarrhea. **Microbes and Infection**,v.3, p.1145-1156.

Lukowicz, G.; Mounier, M.; Leboutet, M.J.; Denis, F.; Goudeau, A.(1985) Evaluation of anew latex test for detecting human rotaviruses in feces. **Pathol Biol** . 33: 681-3.

Maneekarn, N.; Khamrin, P.; Chan-it, W.; Peerakome, S.; Sukchai, S.; Pringprao K., Ushijima H. (2006) Detection of Rare G3P[19] Porcine Rotavirus Strains in Chiang Mai, Thailand,

Provides Evidence for Origin of the VP4 Genes of Mc323 and Mc345 Human Rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.** 44:4113-4119.

Matsubara, E. N. (2005). Condição higiênico-sanitária de meias-cacaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise da utilização de Lista de verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Martella, V.; Ciarlet, M.; Baselga, R.; Arista, S.; Elia, G.; Lorusso, E.; Banyai, K.; Terio, V.; Madio, A.; Ruggeri, F.; Falcone, E.; Camero, M.; Decaro, N.; Buonavoglia, C. (2005) Sequence analyses of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. **Virology**.337;111-123.

Mehnert, D.U.; Stewien, K.E. (1993) Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 140-143.

Mehnert, D.U.; Queiroz, A.P.S.; Santos, F.M.; Candeias, J.M.G.; Hársi, C.M. (1999) Occurrence of human enteric víruses in sewage and surface waters in the city of São Paulo. **Vírus Reviews and Research** 4: 27-30.

Mendez, E.; Lopes, S.; Cuadras, M.A.; Romero, P.; Arias C.F. (1999) Entry of rotaviruses is a multistep process. **Virology**:263(2):450-459

Miotti, P.G.; Viscidi, R.P.; Eiden, J.; Cerny, E.; Yolken, R.H. (1986). Centrifugation augmented solid-phase immunoassay (CASPIA) for the rapid diagnosis of



infectious diseases. **J. Infect Dis.** 154:301-8.

Mir, K.D.; Parr, R.D.; Schroeder, F.; Ball, J.M.(2007) Rotavirus NSP4 interacts with both the amino- and carboxyl-termini of caveolin-1. **Virus Res.** 126(1-2):106-15.

Molina-Bolívar, J.A.; Galisteo-González, F. (2005) Latex immunoagglutination assays. **J. Macrom Science-Polymer Reviews** 45: 59 - 98.

Moon, H. W.(1994) Pathophysiology of viral diarrhea. In: Kapikian, A. L. (Ed.) **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**, p.27-52.

Morinet, F.; Ferchal, F.; Colimon, R.; Perol, Y.(1984) Comparison of six methods for detecting human rotavirus in stools. **Eur J. Clin. Microbiol.** 3: 136-40.

Nakagomi, O.; Nakagomi, T. (1991); Molecular evidence for naturally occurring single VP gene substitution reassortant between human rotaviruses belonging to two different genogroups. **Arch Virol.**119 (1-2):67-81.

Nakata, S.; Petrie, B.L.; Calomeni, E.P.; Estes, M. K.(1987).Electron microscopy procedure influences detection of rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.**25(10):1902-1906

Nuttall, S.D.; Hum. C.P.; Holmes, I.H.; Dyal-Smith M.L.(1989) Sequences of VP9 genes from short and supershort rotavirus strains. **Virology**.;171(2):453-457

Okada, J.; Kobayashi, N.; Taniguchi, K.; Urasawa S. (1999) Analysis on reassortment of

rotavirus NSP1 genes lacking coding region for cystein-rich zinc finger motif. **Arch. Virol.** 144:345-353.

Pacini, D. L.; Brady, M.T.; Budde, C. T.; Connell, M. J.; Hamparian, V. V.; Hughes, J. H. (1988). Polyacrylamide gel electrophoresis of RNA compared with polyclonal and monoclonal antibody based enzyme immunoassays for rotavirus. **J. Clin. Microbiol.** 26, 194-197.

Pai, C.H.; Shahrabadi, M.S.; Ince, B.(1985) Rapid diagnosis of rotavirus gastroenteritis by a commercial latex agglutination test. **J. Clin. Microbiol.** 22: 46-50

Paul, S.K.; Tabassum, S.; Islam, M.N.; Ahmed, M.U.; Haq, J.U.; Shamsuzzaman, A.K.(2006) Diagnosis of human rotavirus in stool specimens: comparison of different methods. **Mymensingh Med J.** 15(2):183-7.

Ponguwanna, Y.; Taniguchi, K.; Chiwakul, M.; Urasawa, T.; Wakasugi, F.; Jayavas, C.; Urusawa, S. (1996) Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **J. Clin. Microbiol.** 34 (5):1050-1057.

Pereira, H.G.; Azeredo, R.S.; Leite, J.P.; Andrade, Z.P.; De Castro L. (1985) A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. **J. Virol. Methods.**;10(1):21-28.

Patton, J.T.; Gallegos, C.O.(1990) Rotavirus RNA replication: single-stranded RNA extends from the replicase particle. **J. Gen. Virol.** 71:1087-1094

- Patton, J.T.; Chen, D. (1999) RNA-binding and capping activities of proteins in rotavirus open cores. **J. Virol.** 3:1382-1391.
- Pereira, HG.; Linhares, A.C.; Candeias, J.A.; Glass, R.I.(1993) National laboratory surveillance of viral agents of gastroenteritis in Brazil. **Bull. Pan. Am. Health. Organ.** ;27(3):224-33.
- Rącz, M. L.; Candeias, J. A. N.; Trabulsi, L. R.; Murahowski, J. (1988) Diarrheal diseases In Brazil: clinical features of rotavirus-associated gastroenteritis in children. **Eur. J . epidemiol.** v. 4, n. 3, p. 382-385.
- Raj, P.; Bhan, M.K.; Prasad, A.; Kumar, R.; Sazawal, S.; Bhandari, N.(1989) Evaluation of a new latex agglutination kit for detection of human rotavirus in faecal specimens. **Indian J. Med. Res.** 89: 165-9
- Ramig, R.F.(2004). Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection. **J. Virol**;v.78; p. 10213-10220
- Rodger, S. M.; Craven, J. A.; Williams, I.(1975) Demonstration of virus-like particles in intestinal contents of piglets with diarrhoea . **Aust. Vet. J.** 51:536
- Roehe, P. R.; Cunha, A. C.; Salvo, E. O.; Martins, R. M.; Rosa, J.C.A.; Oliveira, L.G.; Hoffman, V. L. (1989) Rotavirus in swine in the southern region of Brazil. *Pesq. Vet. Bras* 9(3/4): 45-49
- Saif, L. J.; Jiang, B. (1994) Nongroup A rotaviruses of Humans and Animals. In: Ramig, R.F.

(Ed.). **Current Topics in Microbiology and Immunology (Rotaviruses)**, v.185, p.339-371

Sambourg, M.; Goudeau, A.; Courant, C.; Pinon, G.; Denis, F.(1985) Direct Appraisal of Latex Agglutination Testing, a Convenient Alternative to EnzymeImmunoassay for the Detection of Rotavirus in Childhood Gastroenteritis, by Comparison of Two Enzyme Immunoassays and Two Latex Tests. **J. Clin Microb.** 21: 622-625.

Sanekata, T.; Yoshida, Y.; Okada H.(1981) Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination. **J. Immunol.Methods.** 41: 377-385

Santos, N.; Lima, R.C.; Nozawa, C.M.; Linhares, R.E.; Gouvea, V.(1999)Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment.**J. Clin. Microbiol.** Aug;37(8):2734-6.

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(1):29-56.

Shinozaki, T.; Ushijima, H.; Tajima, T.; Kim, B.; Araki, K.; Fujii, R. (1985). Evaluation of four tests for detecting human rotaviruses in faeces. **Eur. J. Pediatr.** 143, 238.

Sigolo de San Juan, C.; Bellinzoni, R.C.; Mattion, N.; La Torre, J.; Scodeller, E.A.(1986).

Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. **Res Vet Sci.** 41 (2) :270-278

Silva, Juliana da (Org.) ; Erdtmann, Bernardo (Org.) ; Henriques, J. A. P. (Org.) . Genética

Toxicológica. 1. ed. Porto Alegre: Alcance, 2003. v. 1. 422 p.

Smith, E.; Estes, M.; Graham, D.; Gerba, C.(1979). A plaque assay for the simian rotavirus SA-11.**The Journal of General Virology**. 43:513-519

Smith, T.F.; Wold, A.D.; Espy, M.J.; Marshall, W.F. (1993) New developments in the diagnosis of viral diseases. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**; 7: 183-201. Review

Sobestiansky, J.; Barcelos, D. E. S. ; Mores, N.; Oliveira, S. J.; Carvalho, L. F. O. ; Moreno A. M.; Roehle, P. M. .(1999) **Clínica e patologia suína**. 2. ed. Goiânia: v. 1. p. 464.

Stewien, K.E.; da Cunha, L.C.; Alvim, A.C.; Reis-Filho, S.A.; Alvim, M.A.; Brandão, A.A.; Neiva, M.N.(1991) Rotavirus associated diarrhea during infancy in the city of S Luis (MA), Brazil: a two-year longitudinal study. **Rev. Inst. Med.Trop. São Paulo** 33:459-464.

Suzuki, H.; Chen, G.M.; Hung, T.; Beards, G.M.; Brown, D.W.; Flewett, T.H.(1987).Effects of two negative staining methods on the Chinese atypical rotavirus. **Arch. Virol.** 94:(34),305-308

Swierkosz, E. M. (2001) Nosocomial Viral Infections Revisited. **Clin. Microbiol. News** ;23(6):43-48.

Taniguchi, K.; Urasawa, S.(1995) Diversity in rotavirus genomes. **In: Seminars in Virology**.6:123-31.

The Universal Virus Database. ICTVdB- , Version 4 .Microscopia eletrônica de rotavirus

(Disponível on line) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/> (18/08/2008).

Tian Y.; Tarlow, O.; Ballard, A.; Desselberger, U.; McCrae, M.A.(1993) Genomic concatemerization/deletion in rotaviruses: a new mechanism for generating rapid genetic change of potential epidemiological importance. **J. Virol.**;67(11):6625-6632.

Thomas, E.E.; Roscoe, D.L.; Book, L.; Bone, B.; Browne, L.; Mah V.(1994) The utility of latex agglutination assays in the diagnosis of pediatric viral gastroenteritis. **Am J. Clin Pathol.** 101: 742-6.

Tiemessen, C.T.; Wegerhoff, F.O.; Erasmus, M.J.; Kidd, A.H.(1989) Infection by enteric adenoviruses rotaviruses and other agentes in a rural african environment. **J. Med Virol** 28:176-182.

Van Regenmortel, M.H.V.; Fauquet, C.M.; Bishop, D.H.L.; Carstens, E.B.; Estes, M.K.; Lemon, S.M.; Maniloff, J.; Mayo, M.A.; McGeoch, D.J.; Pringle, C.R.(2000) Family Reoviridae. **Virus Taxonomy** Classification and nomenclature of viruses seventh report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press. p.395-433.

Venkataram, B.V.; Estes, M.K. (1997) Molecular basis o rotavirus replication. In:Chiu, W.; Burnett, R.M.; Garcea, R.L **Structural biology of viruses.**: Oxford University Press, p.239-268.

Vesikari, T.; Sarkkinen, H.K.; Maki, M.(1981) Quantitative aspects of rotavirus excretion in childhood. **Acta. Paediatr. Scand.** 70:717-721.

- Vesikari, T.; Isolauri, E.; D'Hondt, E.; Delem, A.; Andre, F.E.; Zissis, G.(1984) Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine.**Lancet**.1(8384):977-981.
- Vende, P.; Piron, M.; Castagné, N.; Poncet, D. (2000) Efficient translation of rotavirus *mRNA* requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukariotic translation initiation factor eIF4G and the *mRNA* 3' end. **J. Virol.** 74:7064-7071.
- Ward, R.; Knowlton, D.; Pierce, M.(1984) Efficiency of human rotavirus propagation in cell culture. **J. Clin. Microbiol.**19:748-753
- Ward, R.L.; Bernstein, D.I.; Young, E.C.; Sherwood, J.R.; Knowlton, D.R.; Schiff, G.M.(1986) Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. **J. Infect. Dis.** 154:871-880.
- Wittum, T.E.; Dewey, C.E.; Hurd, H.S.; Dargatz, D.A.; Hill, G.W.(1995) Herd and litter- level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 1- 3 days of age. **Swine Health Prod.**, 3: 99-104,.
- Wieler, L.H.; Ilieff, A.; Herbst, W.; Bauer, C.; Vieler, E.; Baurfeind, R.; Failing, K.; Klos, H.; Wengert, D.; Baljer, G.; Zahner, H. (2001) Prevalence of Enteropathogens in Suckling and Weaned Piglets with Diarrhoea in Southern Germany. **J. Vet. Med. B** 48, 151-159
- Will, L.A.; Paul, P.S.; Proescholdt, T.A.; Aktar, S. N.; Flaming, K. P.; Janke, B. H.; Sacks, J.; Lyoo, Y. S.; Hill, H. T.; Hoffman, L. J.; Wu, L. L; (1994) Evaluation of rotavirus

infection in diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. **J. Vet. Diagn. Invest.**;6:416-422.

Woode, G. N.; Jones, J.; Bridger, J. (1975) Levels of colostral antibodies against neonatal calf diarrhea virus. **Vet. Rec.**, London, n.97, p. 148-149

Yolken, R.; Wilde, J. (1994) Assay for detecting human rotavirus. In: Kapikian AZ, ed. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. New York: Marcel Dekker, 251-278

Yolken, R.H.; Kim, H.W.; Clem, T.; Waytt, R.G.; Kalica, A.R.; Chanock, R.M.; Kapikian, A.Z. (1977) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. **Lancet**.2:263-267

Zárate, S.; Espinosa, R.; Romero, P.; Méndez, E.; Arias, C.F.; López, S. (2000) The VP5 domain of VP4 can mediate attachment of rotaviruses to cells. **J. Virol.** 74:593-599



