ELIZABETH CRISTINA MOTA MARCONI

**Desenvolvimento de um método de PCR em tempo real para o
diagnóstico de rotavírus suíno do grupo A**

São Paulo

2013

ELIZABETH CRISTINA MOTA MARCONI

**Desenvolvimento de um método de PCR em Tempo Real para
o diagnóstico de rotavírus suíno do grupo A**

**Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Epidemiologia
Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fábio Gregori

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

10/6/13

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2810
FMVZ

Marconi, Elizabeth Cristina Mota

Desenvolvimento de um método de PCR em Tempo Real para o diagnóstico de rotavírus suíno do grupo A / Elizabeth Cristina Mota Marconi. -- 2013.
61 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Gregori.

I. Rotavírus. Grupo A. PCR em tempo real. Detecção. Suínos. NSP5. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARCONI, Elizabeth Cristina Mota

Título: Desenvolvimento de um método de PCR em tempo real para o diagnóstico de rotavírus suíno do grupo A

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Às principais pessoas que contribuíram com minha vitória.

À minha mãe *Maria Aparecida Mota Marconi* que com carinho, amor, dedicação, paciência e muita perseverança mostrou-me o caminho a seguir.

Ao meu pai *José Vicente Marconi* que com carinho, amor, paciência e segurança contribuiu para eu fazer o meu melhor.

Às minhas irmãs *Margareth Henye Mota Marconi* e *Juliane Mota Marconi* que com muito amor, dedicação, paciência foram meu apoio nessa jornada.

À minha afilhada *Ana Júlia Alves Marconi* e minha sobrinha *Ana Luísa Alves Marconi*, por trazerem alegria e amor aos meus dias mesmo com a distância.

Ao *Carlos Roberto Prudêncio* pelo seu amor, paciência, companheirismo, apoio e compreensão nos momentos difíceis para a realização deste estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. *Fábio Gregori*, pela orientação, pela confiança em meu trabalho e pelos conselhos.

Aos professores Drs. *Paulo Eduardo Brandão*, *Leonardo José Richtzenhain* e *Ricardo Augusto Dias* pelas conversas e pelos bons momentos.

Às minhas amigas *Camila Oliveira do Prado* e *Aline Diniz Cabral* pelo convívio, amizade, apoio e incentivo.

À *Sheila de Souza Silva* pelo apoio e assistência.

À *Carlota Pereira Leal (Carol)* pelas conversas e pelo café.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses – VPS pela agradável convivência e incentivo.

A todos os docentes, funcionários do VPS e amigos que direta ou indiretamente cooperaram na realização deste trabalho.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Processo n. 2011/10846-9.

RESUMO

MARCONI, E. C .M. **Desenvolvimento de um método de PCR em tempo real para o diagnóstico de rotavírus suíno do grupo A.** [Development of a real time PCR method for porcine rotavirus group A diagnosis]. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os rotavírus são um dos principais agentes causadores de doenças entéricas em várias espécies animais, com ocorrência generalizada na suinocultura do Brasil. O seu diagnóstico é um componente essencial para estudos epidemiológicos e delimitação de medidas profiláticas visando o controle da doença. Apesar da relevância, não existem testes, tais como PCR em tempo real desenvolvido para detectar a diversidade genética de rotavírus suíno do grupo A (RVA). Este trabalho descreve o desenvolvimento de uma PCR em tempo real com SYBR® Green, para a detecção de rotavírus suíno e os seus resultados comparados com a PCR convencional e ELISA. Foram desenhados primers visando o segmento codificador da proteína NSP5 (137pb) e também foram utilizados primers visando o mRNA do gene mitocondrial bovino NADH5 (191pb) para o controle interno exógeno. Amostras de fezes de suínos de até 60 dias de idade de suínos do estado de São Paulo foram usadas para compor um painel de teste. Foram utilizadas como amostras de referencia o isolado 32/00 (controle positivo de rotavírus suíno do grupo A), concentrado de células MDBK (controle positivo do controle interno exógeno) e água tratada com DEPC (controle negativo). A extração do RNA total foi realizado com Trizol a partir de suspensões fecais contendo MDBK e o cDNA foi sintetizado utilizando primers aleatórios e M-MLV. Para as reações de PCR em tempo real utilizou-se o reagente Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Science). Durante a padronização da PCR convencional, a temperatura de 54°C foi definida como a T_m ótima para a reação. O desempenho do ensaio foi validado em sete amostras positivas inicialmente testadas pelos métodos ELISA e PAGE. O isolado viral RV8209 foi utilizado para determinar o limiar de detecção da PCR em tempo real através de diluições seriadas sendo definido como ponto de corte Ct=33,5 (10^{-12,28}TCID₅₀). O segmento codificador da NSP5 foi clonado no vetor pTZ57R/T submetido a restrição enzimática e usado como alvo para gerar uma curva padrão, onde obteve-se uma eficiência de 93,39%, slope de -3,49 e R² de 0,993. A detecção do controle interno exógeno mostrou 82,9% de

positividade para PCR convencional e 76,31% para a PCR em tempo real, com correlação significativa (0,718). O ensaio de ELISA para RVA apresentou 10,5% (8/78) de positividade, enquanto que as taxas de detecção da PCR em tempo real e PCR convencional foram de 50% (29/58) e 30,1% (24/63), respectivamente. Foi encontrada uma correlação moderada (0,546) entre PCR convencional e PCR em tempo real; baixa (0,056) entre a PCR convencional e ELISA; ausente (0,0) entre a PCR em tempo real e ELISA. Os resultados obtidos sugerem que a detecção por PCR em tempo real para a detecção do rotavírus suíno do grupo A em amostras fecais possa ser utilizada como diagnóstico rápido e eficiente aumentando o repertório dos testes já estabelecidos, de modo a proporcionar uma maior sensibilidade para o diagnóstico clínico e epidemiológico.

Palavras-chave: Rotavírus. Grupo A. PCR em tempo real. Detecção. Suínos. NSP5.

ABSTRACT

MARCONI, E. C. M. **Development of a real time PCR method for porcine rotavirus group A diagnosis.** [Desenvolvimento de um método de PCR em tempo real para o diagnóstico de rotavírus suíno do grupo A]. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Rotavirus is one of the main causative agents of enteric diseases in several animal species with widespread occurrence in Brazilian pig farm. Diagnosis is an essential component for epidemiological studies and delineation of prophylactic measures aiming disease control. Despite the relevance, there are no assays such as real-time PCR developed to detect the genetic diversity of porcine rotavirus from group A (RVA). This work describes the development of SYBR Green real-time PCR assay for the detection of porcine rotavirus and the results were compared with conventional PCR and ELISA. Primers were designed targeting the coding segment of the protein NSP5 (137pb) and also primers targeting the bovine mitochondrial gene mRNA NAD5 (191pb) were used for the exogenous internal control. Fecal samples from pigs up to 60 days of age from São Paulo state were used to compose a panel test. The reference sample was the isolate 32/00 (positive control for porcine rotavirus group A), concentrated MDBK cells (Exogenous Internal Positive Control) and DEPC-treated water (negative control). Total RNA extraction from supernatants of fecal samples containing MDBK cells were carried out with TRIzol reagent and cDNA was synthesized using random primers and M-MLV Reverse Transcriptase. For real-time PCR reactions were used Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Science). For conventional PCR optimization, 54°C was defined as the optimum reaction temperature (T_m). The performance of the assay was validated on seven samples initially tested positive by ELISA and PAGE methods. The limit of detection of the developed real-time-PCR assay was determined using serial dilutions of the isolated RV8209 with $C_t=33,5$ (10-12,28TCID₅₀%). The NSP5 gene segment was cloned into vector pTZ57R/T submitted to enzymatic restriction and used as template to generate a standard curve which Efficiency of 93.39%, slope of -3.49 and $R^2 \square 0.993$. The exogenous internal control showed 82.9% positivity for conventional PCR and 76.31% for real-time PCR with substantial correlation (0.718). The ELISA assay detected porcine RVA in 10,5% (8/78) of fecal samples, whereas the detection rates of

both SYBR Green real-time PCR and conventional PCR assays were 50% (29 of 58) and 30.1% (24 of 63), respectively. A moderate correlation (0.546) was found between conventional PCR and real-time PCR; low (0.056) between the conventional PCR and ELISA; absent (0.0) between the real-time PCR and ELISA. Our findings suggest that detection of Group A porcine rotavirus in fecal samples by use of the real-time PCR assay may be fast and efficient increasing the repertoire of tests established to improve sensitivity for epidemiology and clinical diagnosis.

Keywords: Rotavirus. Group A. Real time PCR. Detection. Swine. NSP5.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR visando a amplificação de um fragmento do gene mitocondrial codificador da NADH-desidrogenase-5 bovina	35
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR visando a amplificação de um fragmento do segmento codificador da proteína NSP5	37
Figura 3 - Alinhamento de um fragmento de 137nt do segmento codificador da proteína NSP5 das amostras de rotavírus suínos 32/00 e 11J (Apêndice A, nº10)	38
Figura 4- Curvas de <i>melting</i> da reação de PCR em tempo real para o controle interno exógeno visando a detecção do gene NADHD5, apresentando T _m de 78,78°C (78,76±0,28)	39
Figura 5 - Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real para o controle interno exógeno visando a detecção do gene NADHD5	39
Figura 6 - Curva padrão da PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5	41
Figura 7 - Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5.....	42
Figura 8 - Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resultados comparativos entre as reações de ELISA e PCR convencional visando o diagnóstico de rotavírus suínos do grupo A	37
Tabela 2- Resultados comparativos entre as reações de ELISA e PCR em tempo real visando o diagnóstico de rotavírus suínos do grupo A	43
Tabela 3 - Resultados comparativos entre as reações de PCR em tempo real e PCR convencional visando o diagnóstico de rotavírus suínos do grupo A.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
aa	Aminoácidos
apud	Citado por
Da	Dalton
DEPC	Dietil-pirocarbonato
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
Ct	<i>Cycle threshold</i>
dNTP	Base nitrogenada (A,G,T,ou C)
et al.	E colaboradores
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
g	Aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
min	Minuto
nt	Nucleotídeo
pM	Picomolar
N	Normal
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solução tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
p/v	Peso/volume
pH	Concentração de hidrogênio iônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para

RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcrição reversa
RVA	Rotavírus do grupo A
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TE	Tampão TRIS-EDTA
Tm	Temperatura de anelamento (<i>melting</i>)
TRIS	Hidroximetil-aminometano
U	Unidade
v/v	Volume/volume

Nota: Em função do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	AMOSTRAS	25
3.1.1	Amostras de Referência	25
3.1.2	Amostras Clínicas	25
3.2	REAÇÃO DE ELISA	26
3.3	EXTRAÇÃO DE RNA	26
3.4	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)	27
3.5	TESTE DOS PRIMERS DO CONTROLE INTERNO EXÓGENO	27
3.6	DESENHO DOS PRIMERS VISANDO O SEGMENTO 11 (NSP5) DO ROTAVÍRUS SUÍNO DO GRUPO A.....	27
3.7	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL PARA A DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS SUÍNO DO GRUPO A	28
3.8	TESTE DO PAINEL DE AMOSTRAS PELA REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL	28
3.9	CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE PCR POR SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	29
3.10	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SYBR® GREEN.....	30
3.10.1	Padronização do Controle Interno Exógeno	30
3.10.2	Padronização da Detecção de Rotavírus Suíno	30
3.11	DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE DETECÇÃO DA REAÇÃO	31
3.11.1	Clonagem Molecular	31
3.11.2	Determinação da Sensibilidade Analítica PCR Convencional	32
3.11.3	Determinação da Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real	32
3.12	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA REAÇÃO.....	33
3.13	DETECÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL	33
3.14	CÁLCULO DA CONCORDÂNCIA	34
4	RESULTADOS	35
4.1	REAÇÃO DE ELISA.....	35
4.2	TESTE DOS PRIMERS DO CONTROLE INTERNO EXÓGENO	35

4.3	DESENHO DOS PRIMERS VISANDO O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA NSP5.....	36
4.4	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL PARA A DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS SUÍNO DO GRUPO A.....	36
4.5	TESTE DO PAINEL DE AMOSTRAS PELA REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL	36
4.6	CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE PCR POR SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	37
4.7	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SYBR-GREEN.....	38
4.7.1	Padronização do Controle Interno Exógeno.....	38
4.7.2	Padronização da Detecção de Rotavírus Suíno	40
4.8	DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE DETECÇÃO	40
4.8.1	Clonagem Molecular	40
4.8.2	Determinação da Sensibilidade Analítica	40
4.9	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA REAÇÃO.....	41
4.10	DETECÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL	41
4.11	CALCULO DA CONCORDÂNCIA	43
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIA	50
	APÊNDICE	60

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura desempenha um importante papel no agronegócio e a sua participação tem crescido anualmente, situando o Brasil como o quarto maior produtor em 2011, mantendo 3,19% da produção e 8,85% da exportação mundial (ABIEPCS, 2013).

Os principais estados produtores são Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná responsáveis por 56,32% da produção brasileira (19.138.000 toneladas), sendo o estado de São Paulo o 4º produtor com 4,58% (155.700 toneladas) (ABIEPCS, 2013).

Com efeito, no intervalo de fevereiro de 2012 a janeiro de 2013 o Brasil exportou 583.418 toneladas arrecadando US\$ 1.502.283, sendo a Rússia, Hong Kong e Ucrânia os principais destinos da carne suína exportada, responsáveis por 67,37% da quantidade de exportações e 73,51% da receita gerada (ABIEPCS, 2013).

No Brasil existem vários sistemas de criação de suínos, indo do mais primitivo até os mais avançados tecnologicamente, mas que trazem consigo implicações quanto a poluição ambiental, saúde pública, eficiência e segurança no processo produtivo (GONÇALVES; PALMEIRA, 2006).

Com a expansão dos rebanhos suínos intensificaram-se também os problemas sanitários, entre eles as diarreias de origem infecciosa, que acometem os leitões principalmente nas fases de maternidade e creche, causando perdas econômicas decorrente do aumento da taxa de mortalidade, baixa conversão alimentar e redução do ganho de peso (ALFIERI et al., 1999; ZLOTOWSKI; DRIEMEIER; BARCELLOS, 2001).

Dentre os agentes infecciosos causadores de diarreia destacam-se o gênero *Rotavírus* devido a sua ocorrência, variações antigênicas, potencial zoonótico e infecção interespecíes. Os suínos são considerados como principal reservatório para a diversidade genética e antigênica dos rotavírus humanos (ALFIERI et al., 1999; PAHO, 2001; COOK et al., 2004)

A rotavirose já foi descrita em diversas criações de suínos em nosso país (RÁCZ et al., 2000; MÉDICI, 2007; GREGORI et al., 2009; NISHIDA, RUIZ, GREGORI, 2009).

A transmissão ocorre principalmente pela via fecal-oral, por meio de partículas virais encontradas no ambiente, na água e nos alimentos contaminados pelas fezes. Os rotavírus possuem tropismo marcante pelas células do intestino delgado, onde os vírions penetram nos enterócitos maduros e inicia-se o ciclo replicativo, culminando com a lise e descamação do epitélio intestinal. As partículas recém liberadas infectam novos enterócitos, contribuindo para a propagação da infecção. A excreção viral nas fezes ocorre na fase aguda da infecção

(em geral até sete dias pós-infecção) (ALFIERI et al., 1999; ALFIERI et al., 2007; MUNFORD; CARUSO; RÁCZ, 2008).

Devido à ausência de envelope, os rotavírus são bastante resistentes às condições ambientais, podendo permanecer viáveis após o tratamento com solventes orgânicos; depois de repetidos ciclos de congelamento e descongelamento; ou ainda após a exposição por uma hora a 37°C; 24 a 48 horas a 25°C; e cinco minutos a 50°C. Permanecem estáveis, também, após a pasteurização do leite e à variação de pH de 3 a 9 (ALFIERI et al., 1999; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A profilaxia das rotaviroses inclui diversas medidas de controle, principalmente no que diz respeito às medidas de caráter higiênico-sanitário. Podemos citar a desinfecção de instalações; isolamento dos animais infectados com objetivo de reduzir a transmissão do vírus aos animais susceptíveis; criação de animais de faixas etárias uniformes; e manutenção de boa condição nutricional dos animais (ALFIERI; ALFIERI; BEUTTEMMÜLLER, 1999).

Em mamíferos domésticos os anticorpos rotavírus-específicos presentes no colostro são importantes na proteção de neonatos, pois podem prevenir a incidência da doença ou reduzir a gravidade da diarreia. Por isso preconiza-se a vacinação das fêmeas gestantes com vacinas inativadas para garantir altos títulos de anticorpos nos colostros. Contudo, a variabilidade antigênica e molecular dos rotavírus representa um obstáculo para a obtenção de vacinas efetivas (ALFIERI et al., 2007).

No momento dispõe-se de vacinas disponíveis no Brasil visando a prevenção da doença em suínos, contendo os sorotipos G4 e G5, a serem utilizadas em matrizes prenhas por meio da administração de duas doses, muito embora existam relatos de falhas de proteção vacinal, tal como relatado por Lorenzetti et al. (2011).

O rotavírus é um vírus pertencente à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, de simetria icosaédrica, não envelopado, cuja partícula viral é esférica e tem 75nm de diâmetro. Seu genoma é composto por onze segmentos de RNA de dupla fita com tamanho total de 18.000pb, codificantes de seis proteínas estruturais (VP1 - VP4 e VP6 - VP7) e seis proteínas não estruturais (NSP1 - NSP6) (FAUQUET et al., 2005; LAMHOUEB et al., 2010).

O capsídeo dos rotavírus é composto por três camadas proteicas, sendo a mais interna, conhecida como *core*, constituída pelas proteínas estruturais VP1 (RNA-polimerase RNA-dependente, ligação ao RNA e formação de complexo com a VP3), VP2 (ligação dependente, requerido para a atividade de replicase da VP1) e VP3 (guaniltransferase, metiltransferase, ligação ao RNA e formação de complexo com a VP1). O capsídeo intermediário é constituído pela VP6 e o capsídeo externo é composto pela VP7 e permeada por 60 espículas formadas de

dímeros da VP4, as quais estão independentemente envolvidas com a indução de anticorpos neutralizantes (KING et al., 2012).

A classificação em grupos sorológicos (sorogrupos) é feita com base na proteína VP6, a qual possui especificidade antigênica e é altamente imunogênica. Até o presente momento foram descritos sete diferentes grupos (A a G), onde todos os membros de cada sorogrupo, independentemente da espécie de origem, apresentam seu próprio antígeno comum que é antigenicamente distinto entre os sorogrupos. Sendo os do grupo A os mais prevalentes na maioria dos surtos em diferentes espécies animais em todo o mundo (ESTES; KAPIKIAN, 2007; NISHIDA; RUIZ; GREGORI, 2009).

Recentemente foi proposto um novo grupo H baseado nas análises de sequências do gene codificador da proteína VP6, o qual apresentou segregação filogenética com os demais grupos conhecidos (MATTHIJNSSENS et al., 2012).

A proteína estrutural VP4 exerce influência direta na patogenicidade e na atenuação das estirpes de rotavírus do grupo A e apresenta epítomos neutralizantes que, juntamente com a VP7, estão associados à neutralização sorotipo-específica e à proteção contra a infecção. A VP4 sofre clivagem enzimática tornando o vírus infeccioso. Essa protease atua no lúmen intestinal, resultando na formação de duas novas proteínas: VP5 e VP8, as quais irão interagir com receptores dos enterócitos (ALFIERI et al., 2007).

Já a classificação em sorotipos é feita com base na reatividade dos vírus frente a dois antígenos independentes e neutralizantes do capsídeo externo, o VP4 e VP7. Dessa forma, pode-se classificar o sorotipo mediado pela VP7 como sorotipo G por ser uma glicoproteína, e pela VP4 como sorotipo P devido ao fato de ser protease sensível (ALFIERI et al., 2007; MUNFORD; CARUSO; RÁCZ, 2008).

Até o momento foram relatados pelo menos 27 diferentes genotipos G e 35 genotipos P (MATTHIJNSSENS et al., 2011), sendo os mais comuns em suínos o G3, G4, G5, G6 e G10 associados com P[6] ou P[7], muito embora já tenham sido descritos outros tipos e combinações. Em bovinos prevalecem o G6, G8 e G10 associados com P[1], P[5] e P[11] (ALFIERI et al., 2007; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Dentre as proteínas não estruturais sabe-se que a NSP1 apresenta diversas características, tais como a extrema diversidade de sequência, uma região rica em cisteína altamente conservada, a atividade de ligação ao RNA, a acumulação no citoesqueleto e segregação não aleatória no rearranjo (BERN; MARTINES; ZOYSA, 1992). A NSP2 é uma NTPase localizada nos viroplasmas, envolvida na virulência e na montagem do capsídeo

(BINES; IVANOFF, 2002). A NSP3 é responsável por iniciar a tradução agindo na inibição da tradução do mRNAs celulares (MONTERO; ARIAS; LOPEZ, 2006).

A NSP4 apresenta atividade enterotóxica pela presença do peptídeo toxigênico. É a única proteína que não se liga ao RNA, estando envolvida com a morfogênese viral servindo como um receptor intracelular para a ligação de subpartículas virais de dupla camada ao retículo endoplasmático na região carboxi-terminal (BALL et al., 1996; MARTELLA et al., 2003).

A NSP5 interage com a NSP2, que inicia sua fosforilação, tendo atividade de quinase (ABRAMSON; BAKER; FISHER, 1999). A NSP6 interage com a NSP5, acumulando-se nos viroplasmas, podendo desempenhar um papel regulador não essencial da infecção por rotavírus, já que alguns rotavírus não possuem a NSP6, sugerindo, assim, um papel facultativo para a replicação viral (MATTION et al., 1991; LOPEZ et al., 2005; RAINSFORD; McCRAE, 2007).

As rotaviroses são espécie-específicas, porém, é possível que ocorra uma transmissão interespecies. Estudos indicaram infecção em humanos por genotipos característicos de rotaviroses animais em diferentes países (STEYER et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2010). Essa modificação pode ocorrer devido ao genoma do rotavírus ser RNA segmentado que favorece os mecanismos de diversidade genética como as mutações pontuais (*drifts*), reestruturações (*shifts-reassortants*), rearranjos (*rearrangements*) e recombinações intragênicas (TANIGUCHI; KOJIMA; URASAWA, 1996; PARRA et al., 2004). Esses eventos resultam em um novo rotavírus com propriedades antigênicas variáveis prejudicando a eficiência das vacinas contra este agente (STEYER et al., 2008; MATTHIJNSSENS et al., 2010).

Para o diagnóstico das rotaviroses dispõe-se de diversas técnicas, cada uma aliando vantagens e limitações. Dentre elas, as mais comumente empregadas são a microscopia eletrônica (ME), eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), ensaio imunoenzimático (ELISA) e reação em cadeia pela polimerase precedida de transcriptase reversa (RT-PCR).

A microscopia eletrônica (ME) apresenta elevada especificidade permitindo a visualização da morfologia característica do *Rotavírus*, porém tem como limitações a baixa sensibilidade diagnóstica, a necessidade de manter a integridade da partícula viral durante o processamento da amostra, o custo do equipamento e disponibilidade de pessoal tecnicamente apto a realizar o diagnóstico (ATHANASSIOUS et al., 1994; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Já a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) é utilizada para detectar a presença dos onze segmentos de RNA do rotavírus diretamente das amostras fecais extraídas

(HERRING et al., 1982). É uma técnica de alta especificidade diagnóstica, possibilitando a detecção do rotavírus pertencente a qualquer grupo (ESTES; KAPIKIAN, 2007). Porém, apresenta baixa sensibilidade analítica, necessitando de uma grande carga viral nas fezes para a geração de sinal. Devido a sua complexidade, torna-se uma técnica de difícil execução para um número grande de amostras (JEREZ, 1997; MÉDICI, 2007).

Por outro lado, a técnica de ELISA é altamente sensível, específica e possibilita o processamento de um grande número de amostras simultaneamente. Porém, como todo teste sorológico está diretamente relacionado com a qualidade dos anticorpos empregados, podendo ocorrer perda de especificidade decorrente de reações inespecíficas e presença de inibidores nas fezes. Outra limitação reside na dificuldade de desenvolvimento de anticorpos específicos para diagnóstico ou caracterização do vírus, com rara disponibilidade comercial (JURE; MORSE; STARK, 1988; MÉDICI, 2007; ASANO, 2009).

Já a RT-PCR não exige viabilidade da estrutura proteica viral, pois a detecção é realizada por meio da amplificação do genoma (MÉDICI, 2007), utilizada tanto para a detecção do agente como também para classificá-los genotipicamente (MATTHIJNSSENS et al., 2011). Esta técnica é altamente sensível e específica, mas que por outro lado, uma das suas dificuldades é a padronização detalhada da reação (HOORFAR et al., 2004), além de poder apresentar resultados falso-negativos, decorrente da presença de substâncias inibitórias em amostras fecais. Neste caso, o uso de um controle interno aumenta a confiabilidade do teste e valida os resultados negativos (HOFFMAN et al., 2009; OIKARINEN et al., 2009).

Outras limitações incluem a necessidade de infraestrutura laboratorial, o tempo para o processamento de amostras, o risco de contaminação do ambiente por DNA amplificado e o uso de substâncias tóxicas, por exemplo, brometo de etídio (GUNSON; COLLINS; CARMAN, 2006; MARTINS; FIEGENBAUM; RUPPWNTHAL, 2011).

Contornando parte destas limitações, a reação de PCR em tempo real vem ganhando espaço, representando um grande avanço no diagnóstico molecular, em função da sua maior acurácia, sensibilidade e especificidade diagnóstica, menor limiar de detecção, facilidade e velocidade no processamento das amostras, possibilidade de quantificação da carga viral, menor exposição a substâncias cancerígenas e minimização de contaminação cruzada devido ao sistema fechado de tubos (MACKAY; ARDEN; NITSCHKE, 2002; PANG et al., 2004).

Os sistemas de detecção da PCR em tempo real utilizam os fluoróforos que são moléculas que proporcionam o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos. O SYBR[®] Green e o TaqMan[®], são os compostos fluorescentes mais utilizados nos sistemas de PCR em tempo real. O sistema SYBR[®] Green baseia-se na emissão de fluorescência deste reagente ao

se intercalar inespecificamente à dupla fita de DNA nas fases de anelamento dos *primers* e a extensão da sequência alvo (MACKAY et al., 2007). Para assegurar a especificidade do produto amplificado há a necessidade de se realizar uma curva de *melting* nas reações (GUNSON et al., 2006; WATZINGER; EBNER; LION., 2006). Considerando a elevada diversidade nucleotídica dos rotavírus, a adoção de mais um componente ao sistema de modo a incrementar a especificidade do teste, tal como ocorre com a abordagem com TaqMan[®], poderia ocasionar resultados falso-negativos (GUNSON et al., 2006).

Nesse sentido, Kang et al. (2004) desenvolveram uma reação de PCR em tempo real visando o gene codificador da VP6 direcionado a amostras de origem humana, com o intuito de determinar carga viral eliminada nos quadros de diarreia.

Já Pang et al. (2004) compararam as técnicas de PCR em tempo real com a PCR convencional para o gene codificador da NSP3 dos rotavírus em amostras de origem humana, observando um aumento da sensibilidade diagnóstica.

Aguirre et al. (2008), por sua vez, desenvolveram uma reação de PCR em tempo real baseada no gene codificador da proteína VP2 enquanto que Meleg et al. (2008) padronizaram uma outra reação tendo como alvo o gene codificador da VP6, ambas destinadas para o diagnóstico da rotavirose humana.

Como vimos, além de serem escassos os diferentes protocolos de PCR em tempo real para o diagnóstico deste agente, o seu desenvolvimento levou em consideração, apenas amostras humanas, que não necessariamente contemplam a variabilidade genética presente nas estirpes suínas de rotavírus.

Existem poucos métodos baseados em SYBR[®] Green visando detectar rotavírus em amostras suínas descritos na literatura. Chun et al. (2010) adotaram como alvo a amplificação do gene codificador da proteína VP6 de rotavírus suínos do grupo C, que a despeito da sua importância, apresenta uma baixa frequência de ocorrência em nosso meio (MEDICI, 2007).

A NSP5 é uma glicoproteína conservada sintetizada pelo 11º segmento, possuindo 667 pb, 198 aa, 21.725 Da, um elevado teor de serina e treonina (25%) e um grande número de lisinas no seu terminal C (CAMPAGNA et al, 2005; CABRAL-ROMERO; PADILLA-NORIEGA, 2006). É uma proteína essencial para o ciclo de replicação viral sendo responsável pela formação do viroplasma juntamente com a NSP2 (MARTIN et al., 2011; MARTIN et al., 2013). A NSP5 sofre fosforilação na célula infectada acumulando no viroplasma, sugerindo, assim, que esta proteína esteja envolvida na replicação do genoma e montagem do nucleio (WELCH; CRAWFORD; ESTES, 1989; CARMONA, 2010).

Considerando este papel fundamental na replicação, a NSP5 apresenta uma elevada conservação (ESTES; KAPIKIAN, 2007), o que acaba por favorecer o desenvolvimento de reações diagnósticas que tenham como alvo este gene.

Dado o exposto, existe uma necessidade para o desenvolvimento de uma técnica de PCR em tempo real que proporcione rapidez, elevada sensibilidade e especificidade diagnóstica de rotavírus suínos do grupo A, sendo esta uma ferramenta útil para a detecção deste agente nas criações animais e consequentemente nas ações de controle e prevenção.

2 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivos:

- a) Desenvolver um método de PCR em tempo real para o diagnóstico de rotavírus suínos do grupo A.
- b) Comparar os resultados da reação de PCR em tempo real frente a reação de PCR convencional e ELISA.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados neste trabalho estão descritos nos itens a seguir:

3.1 AMOSTRAS

Foram utilizadas amostras de referência e de campo descritas a seguir:

3.1.1 Amostras de Referência

Foi utilizada a amostra 32/00 (RODRIGUEZ et al., 2004) como referência de rotavírus do grupo A mantida em cultura de células da linhagem MA-104 (rim fetal de macaco verde). O controle interno exógeno das reações de PCR foi produzido mediante 8 repiques de células MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*) em garrafas de 25cm² com meio MEM acrescido de 5% de soro fetal bovino (InvitrogenTM). Uma vez as células tenham formado uma monocamada na garrafa, elas foram removidas mediante raspagem e concentradas por centrifugação a 5.000g por 10 minutos, sendo o seu volume reduzido para 1mL a partir de 2 garrafas. Um total de 10µL deste precipitado foi adicionado às amostras fecais antecedendo a extração de RNA (item 3.3).

3.1.2 Amostras Clínicas

Foram utilizadas 7 amostras de fezes suínas positivas por ELISA (GREGORI et al., 2000) e PAGE (HERRING et al., 1982) preexistentes no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS) – VPS – FMVZ – USP, para a etapa inicial de padronização da técnica de PCR em tempo real e convencional. Posteriormente, foram coletadas 76

amostras fecais de suínos com até 60 dias de idade provenientes de criações comerciais de suínos do Estado de São Paulo para comporem um painel de teste.

Todos os materiais clínicos foram mantidos em gelo durante a coleta e armazenados a -20°C até o seu processamento nas diferentes reações.

Foram preparadas suspensões fecais a 50% (p/v) em água ultra-pura previamente tratada com 0,1% de DEPC e clarificadas por centrifugação a 12.000g por 15 minutos a 4°C, sendo então utilizado o sobrenadante nas reações sorológicas e moleculares.

3.2 REAÇÃO DE ELISA

Para o teste de ELISA das amostras fecais, empregou-se a metodologia previamente descrita por Gregori et al. (2000), tendo como controle positivo a amostra NCDV de rotavírus do grupo A e negativo o tampão PBS previamente utilizado nas diluições. Este é um método de ELISA direto do tipo “duplo sanduíche” no qual o antígeno é captado em fase sólida (microplaca) por anticorpo de captura policlonal elaborado em carneiro, revelado através de anticorpo revelador elaborado em coelho e um conjugado anti-coelho (com peroxidase).

A leitura da absorbância foi feita em leitor Multiskan EX (Thermo Electron Corporation), com filtro 492nm. Os valores de absorbância obtidos foram expressos através da média aritmética da duplicata de cada amostra.

3.3 EXTRAÇÃO DE RNA

As extrações de RNA das amostras fecais e controles foram feitas empregando-se o reagente Trizol[®] (Invitrogen[®]) de acordo com as instruções do fabricante, tendo sido adicionado ao final do protocolo em 15µL de água previamente tratada com 0,1% de DEPC e mantidos a -20°C até o seu processamento nas etapas subsequentes (item 3.4).

3.4 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

A partir do RNA extraído (item 3.3), as amostras foram submetidas à reação de Transcrição Reversa (RT) utilizando-se *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) randômicos (Invitrogen®), de acordo com o seguinte protocolo:

Desnaturou-se 7µL da amostra de RNA extraído a 95°C/5 minutos, transferindo-a imediatamente em banho de gelo por 10 minutos. Em seguida, o RNA desnaturado foi adicionado à solução “RT-*mix*”, que por sua vez é composta por 4µL de *First Strand Buffer* (Invitrogen®), 2µL de solução de dNTP a 10mM, 2µL de DTT (100mM), 1µL de *Random primers* (50ng/µL - Invitrogen®), 1µL de água e 200U M-MLV *Reverse Transcriptase* (Invitrogen®) para um volume final de reação de 20µL; incubando-a a seguir por 37°C/60 minutos e 70°C/15 minutos.

Os cDNA sintetizados nesta etapa serão utilizados nas reações de PCR convencional e PCR em tempo real (itens 3.8 e 3.13, respectivamente).

3.5 TESTE DOS PRIMERS DO CONTROLE INTERNO EXÓGENO

Foram utilizadas as 7 amostras descritas no item 3.1.2 de modo a testar os *primers* descritos por Caldwell, Raley e Levine (2007), denominados BOVS e BOVAS, específicos para o RNA mensageiro do gene mitocondrial codificador da NADH-desidrogenase-5 bovina, os quais amplificaram um fragmento de 191pb, para validação dos testes de PCR convencional (item 3.8) e também em tempo real (item 3.13).

3.6 DESENHO DOS PRIMERS VISANDO O SEGMENTO 11 (NSP5) DO ROTAVÍRUS SUÍNO DO GRUPO A

Foram obtidas 34 sequências de rotavírus suínos (do grupo A) codificadoras da proteína não-estrutural NSP5 da base pública Genbank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>), provenientes de várias regiões do mundo para o desenho de *primers*.

Todas as sequências foram alinhadas mediante o uso do software Clustal W v. 2.1 (LARKIN et al., 2007), seguida da edição dos fragmentos no programa Bioedit v. 7.1.3.0 (HALL, 1999). Foram identificadas diferentes áreas consensuais e para cada uma delas simulamos diferentes *primers* (senso e antisenso), respeitando a distância máxima entre eles de 150nt, e tendo como parâmetros um tamanho de cada oligonucleotídeo em torno de 18 a 25 bases; porcentagem de G/C em torno de 50%; Tm entre 50 a 55°C; Tm do produto próxima à dos *primers* em até 10°C e ausência de dímeros. Estes parâmetros foram aferidos utilizando-se o software Netprimer (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>).

Tendo atendidos estes requisitos, o par de *primers* selecionado foi submetido ao serviço BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) de modo a verificar sua especificidade com rotavírus do grupo A, em especial os encontrados em suínos.

3.7 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL PARA A DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS SUÍNO DO GRUPO A

Uma vez definidos os *primers* (item 3.6) foi utilizado um *mix* de PCR de acordo com o (item 3.8, a seguir) de modo a definir sua melhor temperatura de hibridização, fazendo-se uso de um termociclador de gradiente, tomando como ponto central (53°C) a média de suas Tm teóricas. Como critério, selecionou-se a maior temperatura que apresentasse à eletroforese em agarose uma maior intensidade de sinal e que não se observasse a formação de bandas inespecíficas. Utilizou-se neste teste as mesmas 7 amostras pré-existentes no laboratório, previamente positivas por PAGE e ELISA (item 3.1.2) e a amostra padrão 32/00 (item 3.1.1).

3.8 TESTE DO PAINEL DE AMOSTRAS PELA REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL

O cDNA das amostras (item 3.4) foram submetidas à amplificação de um fragmento parcial do segmento codificador da proteína não-estrutural NSP5 dos rotavírus do grupo A, utilizando-se as condições de termociclagem descritas no item 4.4, empregando-se os *primers*

desenhados neste estudo denominados NSP5FW1 e NSP5RV137 (item 3.6), de acordo com o seguinte protocolo:

Misturou-se 2,5µL de cDNA (oriundo da reação de RT - item 3.5) à solução “PCR-mix”, que por sua vez é composta por 1x PCR Buffer (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (NSP5FW1 e NSP5RV137 ou BOVS e BOVAS), 2mM de MgCl₂, 1,25U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen®), água q.s.p. 25µL.

Por fim, 10µL dos produtos oriundo desta reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TRIS-borato 0,045M; EDTA 0,001M pH 8,0, fazendo-se corar o gel em banho de água com 0,5µg/mL de brometo de etídio por 10 minutos.

Consideram-se positivas as amostras que apresentaram no gel segmentos amplificados de tamanho correspondente ao desenhado (137pb) e ao controle interno exógeno (191pb) tendo como referência a inclusão de DNA *ladder* 100pb (Invitrogen®) e utilizando-se como controle positivo o isolado 32/00 de rotavírus suíno e como negativo a água empregada em diversas etapas das reações.

3.9 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE PCR POR SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Uma amostra positiva (Apêndice A, nº10/11J) ao PCR convencional selecionada ao acaso e o isolado 32/00 foram sequenciados para confirmar se o fragmento amplificado era proveniente de rotavírus suíno do Grupo A.

Como protocolo, os produtos de PCR foram purificados diretamente do gel de agarose utilizando-se o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare®). Após esta etapa, os produtos foram submetidos a reações de sequenciamento bidirecional utilizando-se o reagente Big-Dye 3.1 (Applied Biosystems®), sendo definidas em equipamento ABI-3500 (Applied Biosystems®), de acordo com protocolos estabelecidos pelo fabricante.

A partir das sequências de nucleotídeos obtidas, foi realizada a conversão do formato de arquivo ABI para o formato FASTA, utilizando-se o software Bioedit v. 7.1.3.0 (HALL, 1999). Foram verificadas as consistências dos achados através do serviço Blast-n do GenBank. As sequências obtidas foram alinhadas entre si e calculada a identidade entre elas.

3.10 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SYBR[®] GREEN

Face aos resultados da reação de ELISA (item 3.2) e RT-PCR convencional (item 3.8) partiu-se para a padronização das condições do teste de PCR em tempo real com SYBR[®] Green.

Para tanto, os ensaios foram realizados utilizando-se o sistema Maxima[™] SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Science) em equipamento StepOne Real Time PCR System (Applied Biosystems[™]) visando a amplificação de duas sequências alvos (e portanto, duas reações em separado): o gene mitocondrial bovino codificador da proteína NADH-desidrogenase como controle interno exógeno (item 3.5) e o segmento codificador da proteína não estrutural NSP5 (item 3.6).

3.10.1 Padronização do Controle Interno Exógeno

Foram utilizados os RNAs extraídos (item 3.3) seguidos das respectivas reações de transcrição reversa (item 3.4) de 7 amostras positivas (item 3.1.2) adicionadas de células MDBK (item 3.1.1) e o controle positivo (apenas células MDBK), todos em triplicata, na seguinte mistura de reagentes: 12,5µL Maxima[™] SYBR green/ROX qPCR Master Mix (2X), 0,3µM de cada *primer* (BOVS/BOVAS), 2µl de cDNA e água nuclease-free em q.s.p 25µL. Utilizou-se o ciclo: 95°C/10 minutos; 40 repetições de 94°C/1 minuto, 55°C/2 minutos e 72°C/1 minuto seguido por uma curva de *melting* padrão do equipamento (95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto; e 95°C por 15 segundos com leitura a cada 0,3°C).

3.10.2 Padronização da Detecção de Rotavírus Suíno

Inicialmente a padronização foi realizada a partir de 7 amostras positivas (aos testes de PAGE e ELISA), preexistentes no laboratório e o controle padrão 32/00, utilizando-se os primers NSP5FW1 e NSP5RV137 (item 3.6) com a temperatura de *melting* definida

anteriormente (item 3.7), concentrações idênticas de reagentes à do controle exógeno (item 3.10.1), todos em triplicata, dentro do seguinte programa: 95°C/10 minutos; 40 repetições de 95°C/1 minuto, 54°C/1 minuto e 72°C/1 minuto; seguido por uma curva de *melting* padrão do equipamento (95°C por 15 segundos; 60°C por 1 minuto; e 95°C por 15 segundos com leitura a cada 0,3°C).

3.11 DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE DETECÇÃO DA REAÇÃO

O limiar de detecção das reações de PCR foi obtido a partir dos procedimentos descritos a seguir:

3.11.1 Clonagem Molecular

O fragmento de 137pb proveniente da amostra 11J de rotavírus (Apêndice A, n°10/11J), com sequência nucleotídica definida (item 3.9), foi clonado em vetor plasmidial, com a finalidade de utilizá-lo como controle adicional de amplificação e de se determinar o limiar de detecção da PCR em Tempo Real.

A preparação das células competentes, a transformação e a seleção das células transformadas foram realizadas de acordo com Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989). Resumidamente, após a purificação do produto de PCR (item 3.9) foi realizada a ligação ao vetor plasmidial pTZ57R/T (Fermentas Life Science), seguindo protocolo do fabricante e incubando-se a 16°C por 14 horas. A partir de 200µL de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α, adicionaram-se 10µL do DNA ligado ao vetor plasmidial e, mediante choque térmico por 30 minutos em banho de gelo, 90 segundos a 42°C e banho de gelo por 2 minutos, obteve-se as células transformadas. Foi adicionado a este tubo 950µL de meio SOC (Invitrogen®), sob agitação de 225 rpm a 37°C durante 1 hora. As células foram plaqueadas em ágar LB (Luria-Bertani) contendo ampicilina (50mg/mL), X-gal (40µg/mL) e IPTG (100mM), e incubadas a 37°C, por 14h. Os clones transformados foram identificados por meio de inspeção visual de colônias. Foi selecionada uma colônia de aspecto branco para crescimento em meio LB com ampicilina, mantendo-a sob agitação de 225rpm a 37°C durante 14 horas.

Foi feita uma PCR utilizando-se o mesmo protocolo descrito no item 3.8, o qual resultou o tamanho do inserto clonado de aproximadamente 137pb, indicando uma correta clonagem molecular. A purificação do plasmídeo foi feita mediante o emprego do *kit* Nucleo Spin® Plasmid Prep (Macherey-Nagel) e quantificado em equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), de acordo com os protocolos estabelecidos pelos respectivos fabricantes.

3.11.2 Determinação da Sensibilidade Analítica PCR Convencional

A amostra viral RV8209, com título de $10^{1,7137}$ TCID_{50%} previamente determinada pelo método de Reed e Muench (1938) foi utilizada para a determinação da sensibilidade analítica dos testes por PCR convencional utilizando diluições seriadas na base 10.

Os produtos das reações de PCR convencional foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com 0,5µg/mL de brometo de etídeo e observado sob luz ultravioleta, determinando-se o limiar de detecção como a última diluição na qual foi detectada a banda específica visível.

3.11.3 Determinação da Sensibilidade Analítica da PCR em Tempo Real

A sensibilidade analítica foi determinada por meio de dois testes, o primeiro deles utilizando diluições seriadas na base 10 da amostra viral RV 8209, com título de $10^{1,7137}$ TCID_{50%} (item 3.11.2).

A outra a partir da solução contendo o plasmídeo purificado e quantificado (item 3.11.1), na qual foi feita uma diluição em base 4, reduzindo-o à concentração de 10,1ng/µL, de modo a atender a recomendação de uso de reagente Maxima™ SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas Life Science). Em se obtendo a concentração ótima, outras 15 diluições sucessivas em base 10 foram feitas e testadas por PCR em tempo real (item 3.10.2), onde se definiu o limiar de detecção, sendo esta a maior diluição capaz de evidenciar o sinal da reação.

3.12 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA REAÇÃO

Inicialmente foi realizada a digestão do DNA clonado com a enzima EcoRI (BioLabs®) para linearizá-lo, de acordo com o seguinte protocolo:

Misturou-se 10U da enzima de restrição, 2µL de 10X Buffer, 2µg de BSA, 240ng do DNA clonado e purifica (item 3.11.1) e água q.s.p. 20µL incubando-a a seguir por 37°C/4 horas e 65°C/15 minutos.

Por fim, 5µL do produto oriundo desta reação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TRIS-borato 0,045M; EDTA 0,001M pH 8,0, fazendo-se corar o gel em banho de água com 0,5µg/mL de brometo de etídio por 10 minutos.

Para a determinação da eficiência da reação foi realizado 5 diluições na base 10 a partir do DNA clonado digerido, previamente quantificado, e submetido ao protocolo de PCR em tempo real (item 3.10.2).

A eficiência da reação foi calculada através da seguinte fórmula, de acordo com Dorak (2007): $\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$

3.13 DETECÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

A detecção do rotavírus suíno do grupo A a partir de um painel contendo 76 amostras de fezes suínas foi realizada mediante o emprego da técnica de PCR em tempo real seguindo as padronizações anteriores de *mix* de reagentes e condições de tempo/temperatura de amplificação (item 3.10.2).

Para a detecção do controle interno exógeno foi utilizado o RNA mensageiro do gene mitocondrial codificador da NADH-desidrogenase-5 bovina, também mediante o emprego das técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real.

3.14 CÁLCULO DA CONCORDÂNCIA

A concordância foi calculada e avaliada por meio do teste Kappa (LANDIS; KOCH, 1977) considerando um intervalo de confiança de 95%, através do software WinEpiscope 2.0 (BLAS et al., 2000) comparando os resultados das técnicas de ELISA, PCR convencional e PCR em tempo real para detecção do rotavírus suíno do grupo A; e entre as técnicas de PCR convencional e PCR em tempo real para a detecção do controle interno exógeno.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão descritos nos itens a seguir:

4.1 REAÇÃO DE ELISA

Foram obtidos 10,52% de amostras positivas para rotavírus (8/76) pela reação de ELISA (Apêndice A).

4.2 TESTE DOS PRIMERS DO CONTROLE INTERNO EXÓGENO

Todas as amostras fecais nas quais foram adicionadas células MDBK apresentaram resultado positivo ao PCR convencional (item 3.5) amplificando exclusivamente um fragmento de 191pb (figura 1). Desta forma, os *primers* (BOVS e BOVAS) foram adotados na validação dos testes de PCR convencional (item 3.8) e em tempo real (item 3.13).

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR visando a amplificação de um fragmento do gene mitocondrial codificador da NADH-desidrogenase-5 bovina

Fonte: (Marconi, E. C. M., 2013)

Legenda: M - Marcador de peso molecular (100pb); 1 e 2 - Amostra fecal suína com células MDBK; 3 - Controle positivo (somente células MDBK); e 4 - Controle negativo (água ultrapura).

4.3 DESENHO DOS PRIMERS VISANDO O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA NSP5

Como resultado, definimos os *primers* NSP5FW1 e NSP5RV137, cujas sequências são respectivamente 5'GGCTTTTAAAGCGCTACAG3' e 5'TGTTCACTCCTACCAATAGATTT3', amplificando um fragmento de 137pb do segmento 11 (NSP5) de rotavírus do grupo A suínos a serem usados nas reações de PCR convencional e em tempo real (itens 3.8 e 3.13), apresentando especificidade para rotavírus suínos junto serviço BLAST e Tm 53,6°C e 53,2°C para o *primer* senso e antissenso, respectivamente.

4.4 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL PARA A DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS SUÍNO DO GRUPO A

Foram testadas 6 diferentes temperaturas (50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C e 55°C), tendo a de 54°C melhor atendido aos citados critérios (item 3.7). Portanto, ficou estabelecido como condições de amplificação ao termociclador o seguinte programa: 95°C/2 minutos; 35 repetições de 95°C/1 minuto, 54°C/ 1 minuto e 72°C/minuto; 72°C/10 minutos e conservando-se os produtos a 10°C.

4.5 TESTE DO PAINEL DE AMOSTRAS PELA REAÇÃO DE PCR CONVENCIONAL

O controle interno exógeno apresentou 82,9% de positividade (63/76) (formação de banda específica de 191 pb).

Estas 63 amostras quando submetidas à PCR convencional para RVA (segmento NSP5) resultaram em 24 positivas e 39 negativas (figura 2), cuja comparação com o teste de ELISA para estas mesmas amostras (item 3.2), está apresentado na tabela 1.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% da PCR visando a amplificação de um fragmento do segmento codificador da proteína NSP5

Fonte: (MARCONI, E. C. M., 2013)

Legenda: M - Marcador de peso molecular (100pb); 1, 4, 6 e 8 – Amostras do painel positivas para rotavírus suíno do grupo A; 2, 3, 5, 7 9 e 10 – Amostras negativas. C+ – Controle positivo (32/00); e C- - Controle negativo (água ultrapura).

Tabela 1- Resultados comparativos entre as reações de ELISA e PCR convencional visando o diagnóstico de rotavírus suínos do grupo A

		ELISA		
		Positivo	Negativo	TOTAL
PCR	Positivo	3	21	24
	Negativo	3	36	39
	TOTAL	6	57	63

4.6 CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE PCR POR SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

O alinhamento entre a amostra padrão de rotavírus suíno do grupo A 32/00 e 11J está demonstrado na figura 3, onde se observa 93,4% de identidade nucleotídica recíproca.

Figura 3 - Alinhamento de um fragmento de 137nt do segmento codificador da proteína NSP5 das amostras de rotavírus suínos 32/00 e 11J (Apêndice A, nº10)

Fonte: (MARCONI, E. C. M.; 2013)

Foram verificadas as consistências dos achados através do serviço Blast-n do GenBank, onde se constatou elevada identidade com amostras de rotavírus suínos. Em conjunto, pode-se concluir a especificidade do produto amplificado pela PCR convencional.

4.7 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL COM SYBR-GREEN

4.7.1 Padronização do Controle Interno Exógeno

A reação de PCR em tempo real para o controle interno exógeno apresentou amplificação do gene mitocondrial codificador da NADH-desidrogenase-5 bovina, sem a apresentação de dímeros de *primers* e Tm única de 78,85°C (figuras 4 e 5).

Figura 4- Curvas de *melting* da reação de PCR em tempo real para o controle interno exógeno visando a detecção do gene NADHD5, apresentando T_m de $78,78^{\circ}\text{C}$ ($78,76 \pm 0,28$)

Fonte: (MARCONI, E. C. M., 2013)

Legenda: MDBK - Amostra de referência (item 3.1.1) utilizado como controle positivo; Amostras Clínicas (item 3.1.2) - Fezes suínas contendo MDBK.

Figura 5 - Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real para o controle interno exógeno visando a detecção do gene NADHD5

Fonte: (MARCONI, E. C. M., 2013)

Legenda: MDBK - Amostra de referência (item 3.1.1) utilizado como controle positivo; Amostra Clínicas (item 3.1.2)– Fezes suínas contendo MDBK.

4.7.2 Padronização da Detecção de Rotavírus Suíno

Como resultado inicial, houve total concordância entre os resultados positivos à PCR em tempo real das 7 amostras utilizadas na padronização das reações, com os testes de ELISA e PCR convencional (NSP5).

4.8 DETERMINAÇÃO DO LIMAR DE DETECÇÃO

O limiar de detecção das reações de PCR foi obtido a partir dos procedimentos descritos a seguir:

4.8.1 Clonagem Molecular

Foi obtida 1 colônia de aspecto branco, sugestiva da ligação do inserto ao vetor plasmidial. Após o crescimento em meio LB líquido contendo ampicilina foi realizado o PCR convencional, confirmando a presença do inserto de 137pb.

4.8.2 Determinação da Sensibilidade Analítica

A sensibilidade analítica da PCR convencional utilizando as diluições da amostra viral isolada RV8209 foi de $10^{-6,28}$ TCID_{50%}, sendo amplificado até a 8ª diluição.

Já para a PCR em tempo real a sensibilidade analítica foi de $10^{-12,28}$ TCID_{50%} (14ª diluição) com o ponto de corte o ciclo de número 33,5 para o teste com a amostra viral isolada RV8209 e de $10^{-8,99}$ ng/μL (10ª diluição) sendo definido o ponto de corte o ciclo de número 31, com as diluições a partir do DNA ligado em vetor plasmidial.

4.9 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA REAÇÃO

A curva padrão da PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5 teve como resultados, uma eficiência de 93,39%; com *slope* igual a -3,49 e R^2 de 0,993 (figura 6).

Figura 6 - Curva padrão da PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5

Fonte: (MARCONI, E. C. M., 2013)

Legenda: Pontos vermelhos – diluição na base 10 do DNA clonado linearizado em concentração a 12ng/μL a $1,2 \times 10^{-4}$ ng/μL; Pontos azuis e verde – amostras de fezes suínas positivas por PCR convencional e PCR em tempo real.

4.10 DETECÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

O controle interno exógeno apresentou 76,3% de positividade (58/76) à PCR em tempo real. Portanto foram contabilizados apenas os resultados provenientes de 58 amostras submetidas à PCR em tempo real para RVA (segmento NSP5), tendo sido 29 delas classificadas como positivas e 29 negativas, e sua respectiva comparação com o teste de ELISA (item 4.1, Apêndice A), está apresentado na tabela 2.

A reação de PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5 apresentou uma T_m específica de 75,09°C com desvio padrão de 2,61 e uma média de Ct de 25,49 ciclos e desvio padrão de 8,28, como demonstrado nas figuras 7 e 8.

Figura 7 - Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5

Fonte: (MARCONI, E. C. M., 2013)

Legenda: O ponto de *melting* específico é de 75,09°C com desvio padrão de 2,61. Amostra 32/00- Isolado de rotavírus suíno do grupo A (item 3.1.1) utilizado como controle positivo apresentando Tm=74,97; 11J - Amostra Clínica (Apêndice A, nº10) apresentando Tm=75,57°C.

Figura 8 - Curvas de amplificação da reação de PCR em tempo real para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5

Fonte: (MARCONI, E. C. M., 2013)

Legenda: 32/00 - Isolado de rotavírus suíno do grupo A (item 3.1.1) utilizado como controle positivo; 11J - Amostra de fezes suína pertencente ao painel de teste (item 3.1.2, Apêndice A, nº10).

Tabela 2- Resultados comparativos entre as reações de ELISA e PCR em tempo real visando o diagnóstico de rotavírus suínos do grupo A

		ELISA		
		Positivo	Negativo	TOTAL
PCR em Tempo Real	Positivo	3	26	29
	Negativo	3	26	29
	TOTAL	6	52	58

Quando comparado os testes de PCR em tempo real e PCR convencional apenas 75% (57/76) foram positivas pelo controle interno exógeno, validando assim as reações. A comparação entre os resultados da detecção do RVA (NSP5) está apresentada na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados comparativos entre as reações de PCR em tempo real e PCR convencional visando o diagnóstico de rotavírus suínos do grupo A

		PCR em Tempo Real		
		Positivo	Negativo	TOTAL
PCR	Positivo	18	2	29
	Negativo	11	26	28
	TOTAL	29	28	57

4.11 CALCULO DA CONCORDÂNCIA

O valor de concordância obtido através do teste Kappa, a um intervalo de confiança de 95%, a partir dos resultados gerados entre os testes de ELISA e PCR foi de 0,056 (baixa concordância); ELISA e PCR em tempo real não houve concordância; e PCR convencional e PCR em tempo real de 0,546 (concordância moderada). Já para os testes do controle interno exógeno foi de 0,718 (concordância substancial).

5 DISCUSSÃO

O rotavírus do grupo A é um dos principais agentes causadores de diarreias em animais de produção, levando a perdas econômicas nas criações de suínos e bovinos em todo o Brasil (CARUZO et al., 2010; MÉDICI et al., 2011). Para minimizar tal impacto e otimizar o sistema de produção na suinocultura, o diagnóstico deste agente tem papel central no estabelecimento de medidas de controle e prevenção, devendo ser levado em consideração a alta variabilidade genética do agente (MATTHIJNSSENS et al., 2010).

Nos estudos de variabilidade genética do rotavírus, Saikruang et al. (2013) observaram novas combinações de G/P (G4P [19] e G9P [19]) que foram relatadas pela primeira vez nesse estudo. As sequências nucleotídicas de VP4 e VP7 destas cepas estavam intimamente relacionadas com rotavírus humanos relatados anteriormente, sugerindo que esses rotavírus suíno foram gerados da recombinação entre os vírus de origem humana e suína.

Miyazaki et al. (2013) avaliaram fezes de leitões de diferentes idades da mesma propriedade num período de 3 anos, observando uma alta variabilidade genética do rotavírus suíno do grupo A. As sequências nucleotídicas obtidas de VP4 e VP7 pertencentes ao mesmo genotipo G ou P eram altamente compatíveis com apenas duas exceções (combinações de diferentes genotipos G ou P), sugerindo que ocorreu um rearranjo genético. Neste estudo eles observaram também que os genotipos predominantes variaram anualmente de acordo com o estágio de desenvolvimento.

Kim et al. (2012) observaram a presença de rearranjos intra-genotipo entre as cepas suína RVA durante um estudo de genotipagem por meio de análises filogenéticas.

Estas evidências mostram a necessidade das reações de PCR levarem em consideração a diversidade genética dos rotavírus e a consequente atualização dos primers desenvolvidos, havendo, assim, uma dificuldade em se obter fragmentos dos genes virais com elevada conservação sobretudo entre rotavírus isolados em diferentes hospedeiros, razão pela qual este estudo abordou tão somente rotavírus suínos.

Dentre as técnicas utilizadas para a detecção do rotavírus suíno a reação de PCR em tempo real surge como um método para ser aliado ao repertório de testes disponíveis, uma vez que apresenta uma alta sensibilidade e especificidade analítica.

Outras potenciais vantagens incluem uma melhor estimativa de quantificação, dispensar a eletroforese, possuir alta versatilidade em função de poder ser aplicadas em áreas que

envolvam não só o diagnóstico, mas também estudos de expressão gênica, detecção de transgênicos entre outras aplicações diversas (NOVAIS; PIRES-ALVES; SILVA, 2004).

O segmento relacionado com a codificação da NSP5 apresenta elevada conservação e com isso minimiza-se a probabilidade de que os *primers* para a sua detecção deixem de hibridizar corretamente aos seus respectivos alvos, evitando situações de resultados falso-negativos. Aliás, este gene tem sido aplicado como alvo de diagnóstico nas mais distintas situações tais como demonstrado por Ye et al. (2012) que desenvolveu uma reação de PCR em tempo real com sistema TaqMan® para a detecção do rotavírus humano do grupo A tendo como alvo esta mesma proteína em amostras de água provenientes de rio e após tratamento prévio para o consumo.

Frequentemente, as amostras fecais apresentam substâncias inibitórias das reações de PCR o qual limita a aplicabilidade do diagnóstico em diversas situações específicas (WILD; EIDEN; YOLKEN, 1990; MONTEIRO et al., 1997). Desta forma, para a discriminação de resultados falso-negativos, aumentar a confiabilidade do teste e validar os resultados negativos há a necessidade de realizar a amplificação do controle interno como meio de reforçar a confiabilidade do teste (HOFFMAN et al., 2009).

O controle interno exógeno do presente trabalho utilizou como referência *primers* previamente descritos por Caldwell, Raley e Levine (2007), visando a detecção do RNA mensageiro do gene mitocondrial codificador da NADH-desidrogenase-5 bovina em amostras de água de efluentes e de tratamento por meio da reação de PCR em tempo real pelo sistema TaqMan®, apresentando uma eficiência da reação de 93%. Esses mesmos *primers* foram também utilizados por Asano et al. (2010) como controle exógeno de uma PCR convencional para a detecção simultânea de rotavírus e coronavírus bovinos, que detectaram o fragmento do gene NADH-5 em 100% das amostras fecais bovinas adicionadas de MDBK.

Portanto, de acordo com a figura 1, durante a padronização do controle interno exógeno da PCR convencional pode ser observado a amplificação específica do fragmento alvo (191bp) e a ausência de amplificação inespecífica. Estes resultados também foram confirmados na PCR em tempo real que apresentou um pico único de T_m com média de 78,76°C e desvio padrão de 0,28°C (Figura 4).

Os *primers* desenhados para o segmento codificador da proteína NSP5 do rotavírus suíno do grupo A apresentaram áreas consensuais entre as 34 sequências obtidas no GenBank, não ocorrendo inclusive a formação de bandas inespecíficas à eletroforese. Adicionalmente, na PCR em tempo real não formação de um pico inespecífico à curva de *melting* (Figura 7) favorecendo, assim, a amplificação específica da reação (Figura 2). Entretanto, não foi possível a padronização de PCR (em tempo real e convencional) para a detecção do gene alvo

e o controle interno em uma única reação em função das diferenças de temperatura de anelamento dos *primers* e ciclos.

A análise da tabela 1 e o respectivo valor de concordância (0,056) demonstram uma disparidade entre os resultados entre PCR convencional e ELISA, sobretudo no que diz respeito ao encontro de 21 amostras positivas à PCR convencional e negativas ao ELISA.

Este resultado pode ser atribuído a duas hipóteses, a primeira decorrente da diferença entre os limiares de detecção destas provas, uma vez que a PCR convencional apresentou uma sensibilidade analítica de $10^{-6,28}$ TCID_{50%} e não existem dados de limiar de detecção para o ELISA empregado.

A segunda explicação seria devido da integridade das proteínas virais, em especial a VP6, que devido a presença de inibidores ou pelos procedimentos de conservação (ciclos de congelamento e descongelamento) tenham sido deletérias, fazendo com que não houvesse reconhecimento dos anticorpos empregados na reação de ELISA e com isso gerando resultados do tipo falso-negativo (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Acrescenta-se ao fato de que estas 21 amostras positivas à PCR convencional também foram positivas através da PCR em tempo real. Portanto, os resultados de concordância entre o PCR em tempo real com estas técnicas nos inclinam a assumir que a reação de ELISA esteja gerando nesta circunstância resultados falso-negativos. Ainda, o sequenciamento dos produtos da PCR convencional (item 4.6) corroboram a especificidade do teste, onde os fragmentos amplificados apresentaram elevada identidade com o rotavírus.

Se comparada a T_m do isolado de rotavírus suíno 32/00 com as amostras de campo podemos observar uma diferença de 0,6°C (74,97 e 75,57°C). A explicação mais provável é que em função das diferenças entre as sequências (6,6%) (item 4.6), particularmente no que diz respeito a presença de ligações G/C, tenha sido observado este fenômeno, mas que, dada a pequena magnitude, não interferiu na interpretação dos resultados, já que os picos de T_m são muito próximos (figura 7).

Yang et al. (2011) desenvolveram uma PCR em tempo real com sistema SYBR[®] Green para detecção do rotavírus do grupo A visando o gene codificador da proteína VP7 em água. Este teste apresentou T_m média de 81°C com desvio padrão de 0,5°C, porém apresentando picos inespecíficos com 68, 74 e 83°C.

Com efeito, a reação de PCR em tempo real para a detecção do RVA apresentou T_m específica média de 75,09°C com desvio padrão de 2,61 (item 4.10) considerando as 29 amostras positivas submetidas a este teste. Essa taxa do desvio padrão pode ser justificada pela variabilidade intragênica mesmo sendo uma região conservada.

Ao fim da padronização de todas as reações foi realizado o teste do painel de amostras por meio da técnica de PCR convencional onde se obteve um total 82,9% de positividade (63/76) para o controle interno exógeno. A partir destas amostras validadas 30,1% (24/63) foram positivas para a detecção do segmento codificador da proteína NSP5. Em comparação à triagem realizada pela técnica de ELISA observou-se uma baixa concordância (0,056) por meio do teste Kappa.

Cabe ressaltar que 6/13 (46,15%) das amostras negativas para o controle interno foram positivas para a detecção do rotavírus suíno por PCR e 3/13 (23,07%) positivas por ELISA.

A sensibilidade analítica do PCR em tempo real foi determinada pela realização dos testes descritos no item 4.8.2, sendo estabelecido o $C_t=33,5^{\circ}\text{C}$ ($10^{-12,28}\text{TCID}_{50\%}$) como ponto de corte, em função de apresentar uma maior concordância com o teste de PCR convencional. Nesta etapa também foi realizado a curva padrão na qual se obteve uma eficiência de 93,39%, *slope* igual a -3,49 e R^2 de 0,993.

Yang et al. (2011) desenvolveram uma reação de PCR em tempo real com sistema SYBR® Green para a detecção do RVA visando o gene codificador da VP7, na qual não foi possível a detecção em concentrações menores que $3,16\text{TCID}_{50\%}/\text{mL}$.

Ye et al. (2012) obtiveram uma eficiência de 106%, *slope*=-3,18 e R^2 de 0,997 para a detecção do rotavírus suíno do grupo A (NSP5); eficiência de 95%, *slope*=-3,45 e R^2 de 0,996 para a detecção de adenovírus humano; eficiência de 95%, *slope*=-3,44 e R^2 de 0,997 para o adenovírus humano do subgrupo; e eficiência de 91%, *slope*=-3,55 e R^2 de 0,997 para enterovírus. Portanto, os valores de eficiência, *slope* e coeficiente de correlação do presente trabalho estão próximos àqueles descritos na literatura, ainda que em diferentes contextos.

Em seguida foi realizado o teste do painel de amostras que apresentou 50% (29/58) de positividade não sendo observado a concordância (0,0) por meio do teste Kappa em comparação com a triagem por ELISA.

Zeng et al. (2008) concluíram que a PCR em tempo real utilizando sistema TaqMan® visando um fragmento do gene NSP3 é um método de diagnóstico mais rápido e sensível que o ensaio imunoenzimático (EIA), pois apresentou 28% a mais de positividade pelo PCR em tempo real do que pelo de rotavírus casos positivos do que identificado pelo EIA.

Devido a essa discrepância de valores constata-se a necessidade de reavaliar a sensibilidade e eficiência das reações de ELISA incluindo as comercialmente disponíveis.

Das amostras positivas por ELISA apenas 55,5% (3/6) foram positivas na PCR em tempo real (tabela 2).

Já em comparação com a PCR convencional houve uma concordância moderada (0,546), onde somente 62,07% (18/29) das amostras positivas por PCR em tempo real também foram positivas por PCR convencional.

Oberste et al. (2010) compararam as sensibilidades relativas do PCR em tempo real por TaqMan[®] e a semi-nested PCR, tendo como alvo a NSP3 e VP1, respectivamente, onde observaram 89% de concordância entre os dois métodos.

Cabe ressaltar que o controle interno exógeno da PCR em tempo real apresentou 76,31% (58/76) de positividade com concordância de 0,718, classificada como substancial (LANDIS; KOCH, 1977) quando comparado com o PCR convencional. Dessas 18 amostras, 10 (55,55%) foram positivas para a detecção do rotavírus suíno por PCR em tempo real e 3 (16,66%) positivas por ELISA.

Essa diferença entre os resultados pode ser justificada devido à reduzida quantidade de RNA mensageiro do gene mitocondrial codificador da NADH-desidrogenase-5 bovina; conservação da partícula; e presença de inibidores inespecíficos nas amostras (WILSON, 1997), sugerindo, assim, um aumento de sua concentração durante a execução do teste, porém esta mesma quantidade foi utilizada com 100% de êxito de acordo com Asano et al. (2010).

Ainda que tenham como alvo regiões de amplificação diferentes, resultados da PCR em tempo real desenvolvida por Pang et al. (2004) apresentaram uma sensibilidade diagnóstica de 87% e especificidade relativa de 90% se comparada à reação de PAGE, no qual foi detectado em 20% das amostras por PCR em tempo real, 18% por *nested* PCR e 13% por microscopia eletrônica.

Os resultados constatados no presente estudo representam os primeiros dados de diagnóstico de RVA em suínos por meio desta nova metodologia. Todos os estudos citados acima utilizaram a técnica de ELISA ou PCR convencional para estimativa da enfermidade; e como foram usadas metodologias diferentes, os resultados devem ser interpretados com cautela.

Em função da importância no agronegócio e na suinocultura brasileira, espera-se que os resultados obtidos nesse estudo contribuam para que a PCR em tempo real possa ser utilizada no diagnóstico rápido e eficiente do rotavírus suíno do grupo A em amostras de fezes suínas aumentando o repertório dos testes já estabelecidos, de modo a proporcionar uma maior sensibilidade para o diagnóstico clínico.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados e discussão anteriores, pode-se concluir que:

- a) Padronizou-se uma reação de PCR convencional para a detecção do rotavírus suíno do grupo A visando o segmento codificador da proteína NSP5.
- b) Padronizou-se uma reação de PCR em tempo real para a detecção do rotavírus suíno do grupo A visando o segmento codificador da proteína NSP5.
- c) Padronizou-se uma reação de PCR em tempo real para a detecção controle interno exógeno visando o RNA mitocondrial do gene mitocondrial codificador da NADH-desidrogenase-5 bovina.

REFERENCIAS

ABIEPCS, Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína. **Estatísticas do Mercado Interno, Mercado Externo e Mercado Mundial**. São Paulo: ABIEPCS, 2013. Disponível em: < <http://www.abiepcs.org.br/pt/estatisticas.html> > Acesso em: 15 abr. 2013.

ABRAMSON, J. S.; BAKER, C. J.; FISHER, M. C. Possible association of intussusception with rotavirus vaccination. **Pediatrics**, v. 104, p. 575, 1999.

AGUIRRE, I. G.; STEYER, A.; BOBEN, J.; GRUDEN, K.; PRIJATELJ, M. P.; RAVNIKAR, M. Sensitive Detection of Multiple Rotavirus Genotypes with a Single Reverse Transcription–Real-Time Quantitative PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2547-2554, 2008.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BEUTTEMMÜLLER, E. A. Rotavírose suína: tópicos sobre etiologia, infecção e controle. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 20, n. 1, p. 90-97, 1999.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BEUTTEMMÜLLER, E. A.; BRITO, B. G.; MÉDICI, K. C. Aspectos Epidemiológicos da Rotavírose Suína na Região Sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciência Agrária**, v. 10, n. 1, p. 5-11, 1999.

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z. I. P. Reoviridae. in: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007.

ASANO, K. M. **Deteção Simultânea de Coronavírus Bovino e Rotavírus do Grupo A em Amostras Fecais de Bovinos Utilizando uma Multiplex Hemi-Nested RT-PCR**. 2009. 88 f. Dissertação. (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ASANO, K. M.; SOUZA, S. P.; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Multiplex Semi-nested RT-PCR with Exogenous Internal Control of Bovine Coronavirus and Group A Rotavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 169, n. 2, p. 375-379, 2010.

ATHANASSIOUS, R.; MARSOLAIS, G.; ASSAF, R.; DEA, S.; DESCÔTEAUX, J. P.; DULUDE, S.; MONTPETIT, C. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 163-169, 1994.

BALL, J. M.; TIAN, P.; ZENG, C. Q. Y.; MORRIS, A. P.; ESTES M.K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, p. 101-104, 1996.

BERN, C.; MARTINES, J.; DE ZOYSA, I. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 70, p. 705-714, 1992.

BINES, J.E.; IVANOFF, B. **Vaccines and Biologicals** - Acute intussusception in infants and children. Incidence, clinical presentation and management: a global perspective. Switzerland: World HealthOrganization , 2002.

BLAS, N.; ORTEGA, C.; FRANKENA, K.; NOORDHUIZEN, K.; THRUSFIELD, M. Win Episcpe 2.0. University of Edinburgh: Clive, 2000.

CABRAL-ROMERO, C.; PADILLA-NORIEGA, L. Association of rotavirus viroplasms with microtubules through NSP2 and NSP5. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 101, n. 6, p. 603-611, 2006.

CALDWELL, J. M.; RALEY, M. E.; LEVINE, J. F. Mitochondrial multiplex real-time PCR as a source tracking method in fecal-contaminated surface waters. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 9, p. 3277-3283, 2007.

CAMPAGNA, M.; EICHWALD, C.; VASCOTTO, E.; BURRONE, O. R. RNA interference of rotavirus segment 11 mRNA reveals the essential role of NSP5 in the virus replicative cycle. **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1481-1487, 2005.

CARMONA, R. C. C. **Diversidade Genética dos Rotavírus Humanos Detectados em Pacientes com Diarréia Aguda no Estado de São Paulo, no Período de 1996 a 2006**. 2010. 83f. Tese. (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

CHUN, Y. H.; JEONG, Y. J.; PARK, S. I.; HOSMILLO, M.; SHIN, D. J.; KWON, H. J.; KANG, S. Y.; WOO, S. K.; KANG, M. I.; PARK, S. J.; CHO, K. O. Development of one-step real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for rapid detection of porcine group C rotaviruses. **The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 74-77, 2010.

COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K.; GOMARA, M.I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infection**, v. 48, p. 289-302, 2004.

DORAK, T. **Real-time PCR**. New York: Taylor & Francis Group, 2007. 362 p.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. IN: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields virology**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1918-1976.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Ed.). **Virus taxonomy**: The eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p. 947-955.

GONÇALVES, R. G.; PALMEIRA, E. M. Suinocultura Brasileira. **Observatorio de la Economía Latinoamericana**, n. 71, 2006.

GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; ROSALES, C. A. R.; CORTEZ, A.; HEINEMANN, M. B.; RICHTZENHAIN, L.; JEREZ, J. A. Desenvolvimento de um método de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 191-194, 2000.

GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; BRANDÃO, P. E.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 707-712, 2009.

GUNSON, R. N., COLLINS, T. C., CARMAN, W. F. Practical experience of high through-put real time PCR in the routine diagnostic virology setting. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, p. 355-367, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, n. 41, p. 95-98, 1999.

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

HOFFMANN, B.; BEER, M.; REID, S. M.; MERTENS, P.; OURA, C. A.; VAN RIJN, P. A.; SLOMKA, M. J.; BANKS, J.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; KING, D. P. A Review

of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the world organization for animal health. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 1-23, 2009.

HOORFAR, J.; MALORNY, B.; ABDULMAWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1863-1868, 2004.

JEREZ, J. A. Diarreias virais dos bezerros: rotavírus e coronavírus. **Biológico**, v. 59, n. 2, p. 33-37, 1997.

JURE, M. N.; MORSE, S. S.; STARK, D. M. identification of nonspecific reaction in laboratory rodent specimens tested by rotavirus ELISA. **Laboratory Animal Science**, v. 38, p. 273-278, 1988.

KANG, G.; GOMARA, M. I.; WHEELER, J. G.; CRYSTAL, P.; MONICA, B.; RAMANI, S.; PRIMROSE, B.; MOSES, P. D.; GALLIMORE, C. I.; BROWN, D. W.; GRAY, J. Quantitation of group A rotavirus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction: correlation with clinical severity in children in south India. **Journal of Medical Virology**, v. 73, p. 118-122, 2004.

KIM, H. H.; MATTHIJNSSENS, J.; KIM, H. J.; KWON, H.J.; PARK, J. G.; SON, K. Y.; RYU, E. H.; KIM, D. S.; LEE, H. S.; KANG, M. I.; YANG, D. K.; HYUN, B. H.; PARK, S. I.; PARK, S. J.; CHO, K. O. Full-length genomic analysis of porcine G9P[23] isolated from pigs with diarrhea in south Korea. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, p. 1427-1435, 2012.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Ed.) **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. 9. ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2012, 1272 p.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.

LAMHOUEB, S.; COOK, A.; POLLARI, F.; BIDAVID, S.; FARBER, J.; MATTISON, K. Rotaviruses from canadian farm samples. **Archives of Virology**, v. 155, p. 1127-1137, 2010.

LARKIN, M.A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LOPEZ, T., ROJAS, M., AYALA-BRETON, C., LOPEZ, S., ARIAS, C.F. Reduced expression of the rotavirus NSP5 gene has a pleiotropic effect on virus replication. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 6, p. 1609-1617, 2005.

LORENZETTI, E.; MEDEIROS, T. N. S.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, v. 154, p. 191-196, 2011.

MACKAY, I. M.; MACKAY, J. F.; NISSEN, M. D.; SLOOTS, T. P. Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries. In: MACKAY, I. M. **Real-Time PCR** in microbiology from diagnosis to characterization. Norfolk: Caister Academic Press, 2007, p. 1-40.

MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in Virology. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 2, p. 1292-1305, 2002.

MARTELLA, V.; CIARLET, M.; CAMARDA, A.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; GREGO, G.; CAVALLI, A.; ELIA, G.; DECARO, N.; TERIO, V.; BOZZO, G.; CAMERO, M.; BUONAVOGLIA, C. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotavirus identified in Italy; emergence of a novel VP genotype. **Virology**, v. 314, p. 358-370, 2003.

MARTIN, D.; CHARPILLENNE, A.; PARENT, A.; BOUSSAC, A.; D'AUTREAU, B.; POUPON, J.; PONCET, D. The Rotavirus nonstructural protein NSP5 coordinates a [2Fe-2S] iron-sulfur cluster that modulates interaction to RNA. **The FASEB Journal**, v. 27, p. 1074-1083, 2013.

MARTIN, D.; OULDALI, M.; MÉNÉTREY, J.; PONCET, D. Structural organisation of the rotavirus nonstructural protein NSP5. **Journal of Molecular Biology**, v. 413, p. 209-221, 2011.

MARTINS, A. F.; FIEGENBAUM, M.; RUPPENTHAL, R. D. **Biologia molecular - aplicando a teoria à prática laboratorial**. Porto Alegre: Editora Sulina, 2011, 118 p.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S. M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRISTER, J. R.; BUESA, J.; ESONA, M. D.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA-GOMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P. P. C.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F. M.; SAIF, L. J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J. T.; DESSELBERGER, U. RANST, M. V. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). **Archives of Virology**, v. 156, n. 8, p. 1397-413, 2011.

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P. H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; RANST, M. V.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v. 157, p. 1177-1182, 2012.

MATTHIJNSSENS, J.; TARAPOREWALA, Z. F.; YANG, H.; RAO, S.; YUAN, L.; CAO, D.; HOSHINO, Y.; MERTENS, P. P. C.; CARNER, G. R.; McNEAL, M.; SESTAK, K.; RANST, M. V.; PATTON, J. T. Simian rotaviruses possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. **Journal of Virology**, v. 84, n. 4, p. 2013-2026, 2010.

MATTION, N. M., MITCHELL, D. B., BOTH, G. W., ESTES, M. K. Expression of rotavirus proteins encoded by alternative open reading frames of genome segment 11. **Virology**, v. 181, n. 1, p. 295-304, 1991.

MÉDICI, K. C. **Rotavírus Grupos A, B e C em Leitões Lactentes: Frequência de Diagnóstico e Avaliação Molecular de Rotavírus Atípicos**. 2007. 125 f. Tese. (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

MÉDICI, K. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Swine Health and Production**, v. 19, n. 3, p. 146-150, 2011.

MELEG, E.; BÁNYAI, K.; MARTELLA, V.; JIANG, B.; KOCSIS, B.; KISFALI, P.; MELEGH, B.; SZÜCS, G. Detection and quantification of group C rotaviruses in communal sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 11, p. 3394-3399, 2008.

MIYAZAKI, A.; KUGA, K.; SUZUKI, T.; KOHMOTO, M.; KATSUDA, K.; TSUNEMITSU, H. Annual changes in predominant genotypes of rotavirus A detected in the feces of pigs in various developmental stages raised on a conventional farm. **Veterinary Microbiology**, v. 163, p. 162-166, 2013.

MONTEIRO, L.; BONNEMAISON, D.; VEKRIS, A.; PETRY, K. G.; BONNET, J.; VIDAL, R.; CABRITA, J.; MÉGRAUD, F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *helicobacter pylori* model. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 995-998, 1997.

MONTERO, H.; ARIAS, C. F.; LOPEZ, S. Rotavirus nonstructural protein NSP3 is not required for viral protein synthesis. **Journal Of virology**, v. 80, n. 18, p. 9031-9038, 2006.

MUNFORD, V.; CARUSO, T. A. R.; RÁCZ, M. L. Gastroenterites virais – Rotavírus. In: TRABALSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 619-623.

NISHIDA, M. K.; RUIZ, V. L. A; GREGORI, F. Detection of rotavirus from pig livestock wastewater of São Paulo State, Brazil. **Ars Veterinaria**, v. 25, n. 3, p. 136-141, 2009.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real – uma inovação tecnológica da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ed. 33, 2004.

OBERSTE, M. S.; PEÑARANDA, S.; ROGERS, S. L.; HENDERSON, E.; NIX, W. A. Comparative evaluation of TaqMan real-time PCR and semi-nested VP1 PCR for detection of enteroviruses in clinical specimens. **Journal of Clinical Virology**, v. 49, p. 73-74, 2010.

OIKARINEN, S.; TAURIAINEN, S.; VISKARI, H.; SIMELL, O.; KNIP, M.; VIRTANEN, S.; HYÖTY, H. PCR inhibition in stool samples in relation to age of infants. **Journal of Clinical Virology**, v. 44, n. 3, p. 211-214, 2009.

PANG, X. L.; LEE, B.; BOROUMAND, N.; LEBLANC, B.; PREIKSAITIS, J. K.; YU IP, C. C. Increased detection of rotavirus using a real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. **Journal of Medical Virology**, v. 72, p. 496-501, 2004.

PAHO. Rotaviral gastroenteritis. In: **Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals: Chlamydioses, rickettsioses and viroses**. 3 ed. Washington: PAHO, 2001, p. 286-294.

PARRA, G.I.; BOK, K.; MARTÍNEZ, M., GOMEZ, J.A. evidence of rotavirus intragenic recombination between two sublineages of the same genotype. **Journal of General Virology**, v. 85, n. 6, p. 1713-1716, 2004.

RÁCZ, M. L.; KROEFF, S. S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T. A. R.; DURIGON, E. L.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E. A. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2443-2446, 2000.

RAINSFORD, E. W.; McCRAE, M. A. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. **Virus Research**, v. 130, p. 193-201, 2007.

REED, L. J.; MUERNCH, H. A Simple method of estimating fifty per cent end-points. **American Journal of Hygiene**, v. 56, p. 493-497, 1938.

RODRIGUEZ, C.A.R., BRANDÃO, P.E., FERREIRA, F., GREGORI, F., BUZINARO, M.G., JEREZ, J.A. Improved animal rotavirus isolation in MA104 cells using different trypsin concentrations. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 71, n. 4, p. 437-441, 2004.

SAIKRUANG, W.; KHAMRIN, P.; CHAIMONGKOL, N.; SUANTAI, B.; KONGKAEW, A.; KONGKAEW, S.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. Genetic diversity and novel combinations of G4P[19] and G9P[19] porcine rotavirus strains in Thailand. **Veterinary Microbiology**, v. 161, p. 255-262, 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning** - a laboratory manual. 2. ed. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1886 p.

STEYER, A.; AK-PRIJATELJ, M. P.; BARLIK-MAGANJA, D.; MARIN, J. I. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. **Journal of General Virology**, v. 89, p. 1690-1698, 2008.

TANIGUCHI K.; KOJIMA, K.; URASAWA, S. Nondefective rotavirus mutants with an NSP1 gene which has a deletion of 500 nucleotides, including a cysteine-rich zinc finger motif-encoding region (nucleotides 156 to 248), or which has a nonsense codon at nucleotides. **Journal of Virology**, v. 70, p. 4125-4130, 1996.

YANG, W.; GU, A. Z.; ZENG, S.; LI, D.; HE, M.; SHI, H. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 84, p. 447-453, 2011.

YE, X. Y.; MING, X.; ZHANG, Y. L.; XIAO, W. Q.; HUANG, X. N.; CAO, Y. G.; GU, K. D. Real-time PCR detection of enteric viruses in source water and treated drinking water in Wuhan, China. **Current Microbiology**, v. 65, p. 244-253, 2012.

WATZINGER, F.; EBNER, K.; LION, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 254-298, 2006.

WELCH, S. K. W.; CRAWFORD, S. E.; ESTES, M. K. Rotavirus sail genome segment 11 protein is a nonstructural phosphoprotein. **Journal of Virology**, v. 63, n. 9, p. 3974-3982, 1989.

WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1300-1307, 1990.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied Environmental Microbiology**, v. 10, n. 63, p. 3741-3751, 1997.

ZENG, C. Q.; HALKOSALO, A.; SALMINEN, M.; SZAKAL, E. D.; PUUSTINEN, L.; VESIKARI, T. One-step quantitative RT-PCR for the detection of rotavirus in acute gastroenteritis. **Journal of Virological Methods**, v. 153, p. 238-240, 2008.

ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D. E. S. N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 1, p. 81-86, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Resultados dos testes de PCR convencional, PCR em tempo real e ELISA para a detecção de rotavírus suínos do grupo a e controle interno exógeno.

Identificação das Amostras	PCR		PCR Tempo Real		ELISA
	ROTA	BOV	ROTA	BOV	
1	N	P	P	P	N
2	N	P	N	P	N
3	N	P	P	P	N
4	N	P	N	P	N
5	N	P	N	P	N
6	N	P	N	P	P
7	N	P	P	P	P
8	N	P	N	P	N
9	N	P	N	P	N
10	P	P	P	P	P
11	N	P	N	P	N
12	N	P	N	P	N
13	N	P	N	P	N
14	N	P	N	P	N
15	N	P	N	P	N
16	N	P	N	P	N
17	N	P	N	P	N
18	N	P	N	P	N
19	N	P	N	P	N
20	P	P	P	P	N
21	N	P	P	P	N
22	P	P	P	P	N
23	N	P	N	P	N

24	P	P	P	P	N
25	P	P	P	P	N
26	N	P	N	P	N
27	N	P	P	P	N
28	P	P	P	P	N
29	N	P	N	P	N
30	N	P	N	P	N
31	N	P	N	P	N
32	N	P	N	P	N
33	N	P	P	P	N
34	N	P	P	P	N
35	N	P	P	P	N
36	P	P	P	P	P
37	P	P	P	P	N
38	P	P	P	P	N
39	P	P	P	P	N
40	P	P	P	P	N
41	P	P	P	P	N
42	P	P	P	P	N
43	N	P	N	P	P
44	P	P	P	P	N
45	N	P	N	P	N
46	P	P	P	P	N
47	P	P	P	P	N
48	P	P	P	P	N
49	P	P	P	P	N
50	N	P	P	P	N
51	P	P	N	P	N
52	N	P	P	P	N
53	N	P	N	P	N
54	N	P	N	P	N
55	N	P	N	P	N
56	P	P	N	P	N

57	N	P	P	P	N
58	P	N	N	P	P
59	P	P	N	N	N
60	N	P	N	N	N
61	N	P	P	N	N
62	P	P	P	N	P
63	P	P	P	N	N
64	P	P	P	N	N
65	N	N	N	N	N
66	N	N	N	N	N
67	N	N	P	N	N
68	P	N	N	N	N
69	N	N	P	N	N
70	N	N	P	N	N
71	N	N	N	N	N
72	P	N	P	N	N
73	P	N	P	N	P
74	P	N	P	N	P
75	P	N	N	N	N
76	N	N	N	N	N
P= Positivo / N= Negativo					