FÁBIO GREGORI

Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criação de suínos, localizadas no Estado de São Paulo

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Jerez

São Paulo

2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1273
FMVZ

Gregori, Fábio

Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criação de suínos, localizadas no Estado de São Paulo / Fábio Gregori. – São Paulo : F. Gregori, 2003.
139 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez.

1. Rotavírus. 2. Genótipos. 3. Virologia. 4. Diarreia. 5. Suínos.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus, a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criações de suínos localizadas no Estado de São Paulo", Protocolo nº 47/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. José Antonio Jerez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/01/2002.

(We certify that the Research "Occurrence and characterization of rotavirus genotypes from fecal material of diarrheic piglets, from many swine-producing units in São Paulo State, Brazil" protocol number 47/2002, under the responsibility of Prof. Dr. José Antonio Jerez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 02/27/2002 meeting.)

São Paulo, 27 de fevereiro de 2002

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain
Vice - Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GREGORI, Fábio

Título: Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criação de suínos, localizadas no Estado de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: 12 / 08 / 2003

Banca Examinadora

Prof. Dr. <u>Mário de Jesus Ruzman</u>	Instituição: <u>UNESP/ Jaboticabal</u>
Assinatura: <u>M. Ruzman</u>	Julgamento: <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. <u>Claudio de Tunes Andrade</u>	Instituição: <u>UFRRJ/ UFRRJ</u>
Assinatura: <u>Claudio de Tunes Andrade</u>	Julgamento: <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. <u>RODRIGO MARTINS SORETO</u>	Instituição: <u>FMVZ/USP</u>
Assinatura: <u>R. Soret</u>	Julgamento: <u>APROVADO</u>
Prof. Dr. <u>LEONARDO J. RICHTEHAIN</u>	Instituição: <u>FMVZ/USP</u>
Assinatura: <u>LMR</u>	Julgamento: <u>Aprovado</u>
Prof. Dr. <u>Jose Antonio Torz</u>	Instituição: <u>FMVZ. USP</u>
Assinatura: <u>J. Torz</u>	Julgamento: <u>Aprovado</u>

AGRADECIMENTOS

***Aos meus pais, irmãos
e Rafael***

***Ao meu orientador
José Antonio Jerez***

Ao Prof. Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos, pelo empenho na condução do curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pelas sugestões e disponibilização do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Rácz, pelas sugestões e disponibilização do Laboratório de Virologia (ICB-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari, pela disponibilização do Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pelas valiosas sugestões a este trabalho.

A Paulo Eduardo Brandão, Carlos Henrique de Azeredo Lima, Cesar Alejandro Rosales Rodriguez, Gianca Silva Monteleone, Silvio Luiz Pereira de Souza, Laura Yaneth Villarreal Buitrago, Adriana Cortez, Vera Letticie de Azevedo Ruiz, Eugênia Márcia de Deus Oliveira, Rosana Tabata, Lara Borges Keid, Paula Tavoraro, Sidnei Miyoshi Sakamoto, Fabiana Miraglia, Leandro Ratte de Oliveira e Ricardo Augusto Dias pela ajuda, amizade e incentivo.

Ao Sr. Alexandre Abelardo Sanches, técnico do Laboratório de Virologia, pela sua dedicação, eficiência, e apoio neste e nos demais trabalhos realizados no Laboratório de Virologia (VPS-USP).

A Dr^a. Veridiana Munford, do Laboratório de Virologia (ICB-USP), pelo auxílio neste trabalho.

A Dr^a Daniela Pontes Chiebao, Médica Veterinária Residente do VPS-USP, pelo auxílio neste trabalho.

Ao Dr. Silvio Borges, da Coordenadoria de Defesa Agropecuária do Estado de São Paulo, pela ajuda na colheita de amostras e contatos com produtores rurais.

Aos colegas do curso de pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses – VPS e do curso de graduação em Pedagogia da Faculdade de Educação da Universidade de São Paulo, pela agradável convivência e incentivo.

A Flávio Henrique Jerez e Nicolas Augusto Jerez, pela amizade e incentivo.

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

A Daniela de Melo Julianetti, em todos os momentos.

Este trabalho contou com o apoio financeiro da

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Processo n. 99/05912-9

RESUMO

GREGORI, F. **Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criação de suínos, localizadas no Estado de São Paulo.** [Occurrence and characterization of rotavirus genotypes from fecal material of diarrheic piglets, from many swine-producing units in São Paulo State, Brazil]. 2003. 139 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Um total de 144 amostras fecais colhidas de leitões com diarreia provenientes de diversas granjas distribuídas por 10 municípios do Estado de São Paulo, Brasil, foram examinadas para a presença de rotavírus através de eletroforese em gel de poliacrilamida e ELISA, num esquema de triagem em paralelo. Destas, 24 e 39 amostras foram, respectivamente, positivas por estes testes e a caracterização dos genótipos P e G foi realizada em 43 amostras por nested RT-PCR, usando diferentes conjuntos de primers. Utilizando-se primers animais, o genótipo P[6] foi o mais freqüente, detectado em 25,58% das amostras, seguido pelo P[1] (11,62%) e P[7] (9,3%). Infecção concomitante de genótipos P[6]+P[7] (9,3%), P[1]+P[6] (4,65%), P[1]+P[6]+P[7] (2,32%) foi também observada. O genótipo G[5] foi o mais freqüente, detectado em 30,23% das amostras, seguido pelo G[10] (20,93%) e G[6] (4,65%). Infecção concomitante de genótipos G[5]+G[10] (18,6%) foi também observada. Utilizando-se primers humanos, somente o genótipo P[6] (65,11%) foi encontrado. Foram detectados os genótipos G[4] (27,9%), G[3] (13,95%) nas amostras, e as infecções concomitantes G[3]+G[4] (9,3%), G[2]+G[3]+G[4] (4,65%) e G[2]+G[3] (2,32%). A combinação mais freqüente foi G[5]P[6] e G[4]P[6], porém foram encontradas também infecções mistas, genótipos atípicos e reassortants. O seqüenciamento do gene a partir dos produtos de nested PCR dos genótipos animais P e G mostrou diversidade de nucleotídeos e aminoácidos dentro de um

mesmo genotipo. As árvores filogenéticas utilizando o critério de máxima parcimônia e o algoritmo branch-and-bound, tiveram topologias nas quais as seqüências de nucleotídeos geradas neste trabalho concordam com as outras descritas anteriormente e pertencentes a um mesmo genotipo, suportadas por índices aceitáveis de “bootstrap”. Os resultados deste estudo, além de contribuir para um melhor entendimento da epidemiologia dos rotavírus suínos, é relevante ao mostrar que além de haver uma diversidade de genotipos circulantes no campo, há também dentro dos mesmos genotipos, e isto deve ser considerado ao se utilizar e desenvolver métodos de diagnóstico, bem como ao se adotarem medidas preventivas específicas contra esta doença.

Palavras-chave: Rotavírus. Genotipos. Virologia. Diarréia. Suínos.

ABSTRACT

ABSTRACT

GREGORI, F. **Occurrence and characterization of rotavirus genotypes from fecal material of diarrheic piglets, from many swine-producing units in São Paulo State, Brazil.** [Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criação de suínos, localizadas no Estado de São Paulo]. 2003. 139 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

A total of 144 fecal specimens collected from piglets with diarrhea from many swine-producing units distributed among 10 municipalities of São Paulo State, Brazil, were examined for rotavirus by polyacrylamide gel electrophoresis and ELISA, in a parallel screening scheme. Twenty-four and thirty-nine samples, respectively, were positive by these tests and the characterization of the P and G genotypes was performed on 43 samples by a nested reverse transcription-PCR typing assay, using different sets of primers. Using the animal set of primers, the P[6] genotype was the most frequent, accounting for viruses in 25.58% of the samples, followed by P[1] (11.62%) and P[7] (9.3%). Concomitant infection of P[6]+P[7] (9.3%), P[1]+P[6] (4.65%), P[1]+P[6]+P[7] (2.32%) genotypes was also observed. The G[5] genotype was the most frequent, accounting for viruses in 30.23% of the samples, followed by G[10] (20.93%) and G[6] (4.65%). Concomitant infection of G[5]+G[10] (18.6%) genotypes was observed. Using human set of primers, only the P[6] (65.11%) genotype was found. It was detected the genotypes G[4] (27.9%), G[3] (13.95%) on the samples. Concomitant infection of the genotypes G[3]+G[4] (9.3%), G[2]+G[3]+G[4] (4.65%) and G[2]+G[3] (2.32%) was also observed. The more frequent combination were G[5]P[6] and G[4]P[6], but it was found mixed infections, atypical genotypes and reassortants. Gene sequencing of nested products of G and P animal genotypes showed a diversity of nucleotides and aminoacids under the same genotype. The phylogenetic

trees for P and G genotypes under the maximum parsimony criterion, using the branch-and-bound algorithm, had topologies in which the nucleotide sequences generated by this work agree to others described elsewhere that have the same genotypes, supported by acceptable scores of bootstrapping. The results of the present study, while contributing to a better understanding of epidemiology of porcine rotaviruses, address the relevance that there is not only a diversity of genotypes circulating on the field, but inside the same genotypes, and this must be considered when using and developing diagnostic tests, as well when carrying out specific preventive measures against this disease.

Key words: Rotavirus. Genotypes. Virology. Diarrhea. Swine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg = micrograma
µL= microlitro
apud = citado por
DEPC = dietil-piro-carbonato
DMSO = dimetil-sulfóxido
DNAc = ácido desoxirribonucléico complementar
dNTP = base nitrogenada (A,G,T,ou C)
et al.= e colaboradores
ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA = ácido etileno-di-amino-tetra-acético
g = aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s²)
M= molar
mA= miliamper
mg=miligrama
mL= mililitro
mM= milimolar
min = minuto
pM = picomolar
N = normal
nm = nanômetro
PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida
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 ribonucléico
RT = transcrição reversa
s = segundo
SDS= dodecilsulfato de sódio
TE = Tampão TRIS-EDTA
TEMED= tetrametiletenodiamina
TRIS= hidroximetil-aminometano
U = unidade internacional
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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	22
3	OBJETIVOS	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1	AMOSTRAS FECAIS	43
4.2	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)	44
4.2.1	Preparo do material fecal para a PAGE	44
4.2.2	Extração do RNA viral para a PAGE	44
4.2.3	Preparo do gel de poliacrilamida	45
4.2.4	Condições de corrida eletroforética	46
4.2.5	Coloração com nitrato de prata	47
4.2.6	Interpretação dos resultados	48
4.3	REAÇÃO DE ELISA	48
4.3.1	Preparo da amostra fecal para a reação de ELISA	48
4.3.2	Condições de teste	48
4.4	CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DE PAGE E ELISA	50
4.5	REAÇÃO DE RT-PCR	50
4.5.1	Extração de RNA para reação de transcrição reversa	53
4.5.2	Reação de Transcrição Reversa	53
4.5.3	Primeira Amplificação	54
4.5.4	Segunda amplificação	54
4.6	ANÁLISE POR SEQUENCIAMENTO	55
4.6.1	Extração, quantificação de DNA e reação de sequenciamento	56
4.6.2	Precipitação com isopropanol e etanol	57
4.6.3	Preparo da amostra para sequenciamento	58
4.7	ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS	58
5	RESULTADOS	61
5.1	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)	62
5.2	REAÇÃO DE ELISA	62
5.3	CONCORDÂNCIA RELATIVA ENTRE O ELISA E PAGE	62
5.4	REAÇÃO DE RT-PCR	63
5.5	REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO E GENEALOGIA	69
5.5.1	Sequenciamento dos genotipos P e genealogia	69
5.5.2	Sequenciamento dos genotipos G e genealogia	80
6	DISCUSSÃO	94
7	CONCLUSÕES	116
	REFERÊNCIAS	120
	ANEXO	134

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As diarreias em animais neonatos constituem-se em uma entidade mórbida de etiologia complexa e distribuição mundial, acarretando graves prejuízos à exploração econômica racional dos animais de produção, quer pela mortalidade, diminuição na produtividade e custos com tratamentos (KANEENE; HURD, 1990). Aliado a esse quadro, o diagnóstico, caracterização antigênica e molecular dos agentes etiológicos de diarreias animais pode ser justificado num contexto epidemiológico pelo fato de tais entidades mórbidas se constituírem, em alguns casos, como zoonoses.

Em relação aos agentes virais, merece destaque o gênero *Rotavirus*, dada a sua ocorrência, variações antigênicas e potencial zoonótico (ESTES, 1996).

As infecções por rotavírus já foram assinaladas em diversas propriedades de criação de suínos no Brasil (ALFIERI et al., 1994; BITTENCOURT; RÁCZ, 1992; GATTI et al., 1989; SAN JUAN et al., 1986), demonstrando que esse agente está bastante disseminado.

Entretanto, são poucas as descrições acerca da caracterização de genótipos de rotavírus envolvidos em surtos de diarreias em criações de suínos no Estado de São Paulo, sendo, portanto, uma das prioridades que necessita ser urgentemente investigada, a fim de que se possa realizar alguma contribuição na epidemiologia da doença, o que tem importância em relação à proteção dos suscetíveis através de vacinação. Sendo a imunidade sorotipo específica (CUNLIFE, 2002), é recomendável que os sorótipos ou genótipos G e P circulantes sejam rotineiramente monitorados, para que

se atue com mais segurança na imunoprofilaxia da infecção (MASCARENHAS et al., 1998).

A análise da diversidade molecular dos rotavírus, empregando-se o seqüenciamento de nucleotídeos dos genes codificadores das proteínas VP4 e VP7, permite que se observem variações com maior nível de detalhamento neste vírus, podendo levar a uma melhor compreensão das relações entre genótipos diversos e entre amostras que apresentem os mesmos genótipos.

Além disso, a caracterização dos rotavírus pode fornecer informações importantes acerca do seu caráter zoonótico e da possibilidade de transmissão interespécies, da ocorrência de infecções mistas e de genótipos atípicos de rotavírus em suínos.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

As diarreias em animais representam uma das principais causas de morbimortalidade do período neonatal (SCHUDEL et al., 1985), 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 o agravamento dos quadros (SNODGRASS et al., 1986).

Em suínos, por exemplo, vários agentes infecciosos podem estar envolvidos na etiologia das diarreias; entretanto, estão mais comumente associados ao processo infeccioso os rotavírus, *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Isospora suis*, *Eimeria* spp e *Cryptosporidium* sp (WIELER et al., 2001).

Dentre os agentes virais, o gênero *Rotavirus* constitui-se na maior causa de gastroenterite infecciosa em crianças e animais neonatos (ESTES, 1996), tendo uma distribuição geográfica mundial (ACHA; SZYFRES, 1986).

A primeira evidência da participação dos rotavírus em quadros diarreicos ocorreu ao se reproduzir experimentalmente um quadro de diarreia em bezerros, utilizando como inóculo um filtrado (livre de bactérias) de material fecal oriundo de bezerros com diarreia. Na ocasião, foi possível identificar partículas virais sob microscopia eletrônica, as quais foram denominadas de NCDV ou "Nebraska Calf Diarrhea Virus" (MEBUS et al., 1969¹ apud LU et al., 1995).

¹ MEBUS, C. A.; UNDERDAHL, N. R.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Calf diarrhea (Scours): reproduced with a virus from a field outbreak. **University of Nebraska Research Bulletin**, v. 233, p. 1–16, 1969.

Posteriormente, White, Mebus e Twiehaus (1970) constataram a presença deste vírus em 69 surtos de diarreia em bovinos em diferentes regiões dos Estados Unidos, fornecendo uma idéia de sua disseminação.

Welch (1971) e Fernelius et al. (1972) verificaram semelhanças entre estas partículas virais com as dos Reovírus, originando a denominação NCDR (Neonatal Calf Diarrhea Reovirus-like).

Bishop et al. (1973) utilizando microscopia eletrônica ao examinar fluido duodenal de crianças com diarreia foram os primeiros a identificar rotavírus em humanos. Quase simultaneamente, Flewett, Bryden e Davies (1973) identificaram o vírus por método similar no Reino Unido.

Flewett et al. (1974) verificaram que as partículas virais presentes em material fecal de crianças com gastroenterites agudas e de bezerros com quadro clínico de diarreia eram morfologicamente indistinguíveis à microscopia eletrônica. Além disso, baseados na identidade antigênica apresentada por estas partículas nas reações de imunofluorescência e de imunomicroscopia eletrônica realizadas com o soro de crianças convalescentes, foi proposta a denominação de "rotavírus" para agrupá-las.

Posteriormente, em 1978, o "International Committee on Taxonomy of Viruses" propõe a criação do gênero *Rotavirus*, dentro da Família Reoviridae (MATTHEWS, 1979).

As partículas virais completas dos rotavírus são esféricas, apresentando diâmetro de 75 nm; possuem capsídeo icosaédrico com 3 camadas protéicas e não são envelopadas (ESTES, 1996).

De acordo com Dodet et al. (1997), existem, nos rotavírus, 6 proteínas estruturais, denominadas VP (do inglês "viral protein"), e 5 proteínas não-estruturais, denominadas NSP (do inglês "non-structural protein").

A camada protéica mais interna é denominada “core” (Figura 1), sendo constituída pelo VP1, VP2 e VP3, os quais formam uma estrutura que contém o material genético, composto por 11 segmentos de RNA de fita dupla, com o tamanho total do genoma de aproximadamente 18.000 pares de bases (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996). O rearranjo gênico entre os segmentos de RNA ocorre naturalmente e pode ser reproduzido *in vitro* (DODET et al., 1997). Com menor frequência pode ser encontrado o “core” isoladamente sob a forma de agregados, desprovido de RNA e com a RNA-polimerase RNA-dependente inativa; de modo artificial, podem-se obter estas partículas pelo tratamento das partículas rugosas por cloreto de cálcio 1,5 M (ESTES, 1996).

Figura 1 - Representação esquemática da partícula de rotavírus. Observam-se os 11 fragmentos discretos de dsRNA e as proteínas estruturais (VP) e não estruturais (NSP), por eles codificadas. À direita está uma representação tridimensional da partícula, onde a camada externa e intermediária foram parcialmente removidas, expondo a camada interna. Figura modificada de Kapikian e Chanock (1996)

Segundo Mattion, Cohen e Estes (1994), a camada protéica mais externa corresponde ao VP7, e a camada intermediária ao VP6. Sessenta espículas (hemaglutininas), denominadas de VP4, estão ancoradas no VP6 e projetam-se pelo VP7 (Figura 1). Ainda com relação ao VP4, este é sensível a ação de enzimas proteolíticas, pelas quais, quando clivado, origina o VP5 e VP8, tendo como consequência uma potencialização da infectividade. Partículas sem o capsídeo externo são também encontradas, sendo denominadas de partículas rugosas, podendo ser obtidas artificialmente pelo tratamento da partícula viral completa por EDTA 10mM; o aspecto rugoso apresentado por esta partícula incompleta é devido às projeções das subunidades triméricas do capsídeo interno, e, apesar de não serem infecciosas, mantêm ativa sua RNA-polimerase RNA-dependente (ESTES, 1996).

Os rotavírus apresentam 3 importantes especificidades antigênicas: grupo, sub-grupo e sorotipo. Este critério permite a classificação de múltiplos grupos (ou sorogrupos) e a existência de múltiplos sorotipos dentro de cada grupo (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996).

Estudos utilizando diversas técnicas sorológicas, entre elas a imunofluorescência, ensaios imunoenzimáticos e imunomicroscopia eletrônica, revelaram que os rotavírus possuem um antígeno comum, presente no capsídeo intermediário da partícula viral (VP6) denominado de antígeno de grupo. Até o presente momento foram descritos 7 diferentes grupos: A, B, C, D, E, F, e G (ESTES, 1996). Dentre estes, os rotavírus do grupo A são os mais prevalentes (LUCHELLI et al., 1994).

Os epítomos de reatividade cruzada presentes nos grupos estão presentes em todas as proteínas estruturais e não estruturais, porém em ensaios de diagnóstico o

VP6 é o grupo antigênico predominantemente detectado, provavelmente por constituir 51% do vírion e ser altamente imunogênico (KAPIKIAN;CHANOCK, 1996). Assim, embora existam diferenças entre os rotavírus do grupo A, quer em amostras animais ou humanas, a detecção imunológica destes vírus, inclusive pela prova de ELISA, é facilitada pelo fato de todas as amostras conhecidas do grupo A compartilharem epítomos de reatividade cruzada localizados na proteína VP6 (MATTION et al., 1994; YOLKEN; WILDE, 1994).

Outros epítomos, denominados antígenos de subgrupo, foram definidos sorologicamente também com base no VP6 e têm sido usados como marcadores epidemiológicos para os rotavírus do grupo A, dada a possibilidade de ajudar na diferenciação das amostras (KAPIKIAN; CHANOCK, 1996; MATTION; COHEN; ESTES, 1994).

Os rotavírus são classificados em sorotipos definidos pela reatividade dos vírus frente a dois antígenos independentes e neutralizantes do capsídeo externo: o VP4 e o VP7. Assim, pode-se caracterizar o sorotipo mediado pela VP7, denominado sorotipo G por ser o VP7 uma glicoproteína, e pela VP4, denominado sorotipo P devido ao fato do VP4 ser protease sensível (ESTES, 1996).

Um sistema de classificação baseado no genotipo também tem sido proposto, que faz uso de técnicas moleculares, dentre elas a hibridização de RNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR) (DAS et al., 1994; GENTSCH et al. 1992; GOUVEA et al., 1994; GOUVEA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994b; TANIGUSHI et al., 1992), embora a correlação biológica entre os genotipo e sorotipo (P) não tenha sido claramente estabelecida. Segundo Estes (1996), nem todos os vírus em cada genotipo P foram caracterizados num sorotipo P. Estudos preliminares indicaram que vírus pertencente a um único genotipo P pode eventualmente ser caracterizado

em dois sorotipos P, fato este que não ocorre quanto aos sorotipos e genotipos G, onde há concordância na classificação. A genotipagem apresenta como vantagens o contorno as dificuldades de produção de reagentes para sorotipagem, a possibilidade de classificação de amostras não tipadas anteriormente, e guarda boa correlação com a especificidade antigênica (GOUVEA et al., 1990; PARWANI et al., 1993). Convencionou-se na notação gráfica que os genotipos de rotavírus sejam acompanhados de colchetes, particularmente importante na designação P, onde não há concordância total entre sorotipos e genotipos, como sugerido por Hoshino e Kapikian (2000).

Até o momento foram descritos 14 sorotipos e genotipos G, embora Rao, Gowda e Reddy (2000) tenham encontrado um novo sorotipo em bezerros; 11 sorotipos (sendo que 4 destes apresentam subtipos) e 19 genotipos P (REGENMORTEL et al., 2000).

Os sorotipos G6 e G10 são os mais prevalentes em bovinos (SNODGRASS et al., 1990), enquanto que os sorotipos G5 e G11 predominam em suínos (GOUVEA et al., 1994). Além destes, em suínos já foram descritos os sorotipos G1, G3, G4, G9, e G10 (WINIARCZYK et al., 2002). Estes mesmos autores detectaram dentre as amostras suínas oriundas dos Estados Unidos os genotipos G[3], G[4], G[5], G[9] e G[10] em combinação com genotipos P[6] e P[7], enquanto que nas amostras oriundas da Polônia, somente G[3], G[4] e G[5], em combinação com os genotipos P[6] e P[7].

Na Tailândia, Pongswanna et al. (1996) detectaram em suínos a presença predominante de sorotipos G10 e G3, bem como a ocorrência de rotavírus pertencentes aos grupos B e C, ainda que estes dois últimos numa frequência inferior àquela do grupo A. Além disso, os mesmos autores sugerem condições

ecológicas na Tailândia que seriam capazes de favorecer a transmissão interespecies, entre elas a especificidade sorológica de uma amostra suína isolada similar a uma amostra bovina G10, bem como a elevada frequência deste sorotipo em bovinos desta região.

Ainda com relação a amostras bovinas, uma grande variedade de sorotipos e genotipos e amostras pertencentes a sorogrupos não-A já foram encontrados em casos de diarreias por rotavírus em bezerros. Hussein et al. (1993), utilizando sondas de DNA, confirmaram a existência dos genotipos G1, G2, G3 e G11 entre amostras fecais de bezerros diarreicos nos Estados Unidos. Tsunemitsu et al. (1999) identificaram, através de imunoeletromicroscopia, imunofluorescência, eletroferotipagem e RT-PCR, como pertencente ao grupo B dos rotavírus uma amostra patogênica para bezerros.

Fukai et al. (2002) observaram a dinâmica dos rotavírus bovinos, na qual em 1995 havia predominância de G10P[11], sofrendo uma drástica mudança no ano seguinte, tendo como predominante G8 e P[1], P[5] e P[11] em diversas combinações. Já em 1997 e em 1998, G[6] P[5] torna-se o genotipo mais comum.

O sorotipo G6 dos rotavirus são patógenos comuns em bezerros, mas raramente encontrados em humanos, no entanto, Diwakarla, Clark e Palombo (2002) denotam o aumento da ocorrência deste genotipo em humanos na Austrália.

Em crianças na África do Sul, Steele et al. (2003) relatam que no final da década de 1990 predominava a ocorrência do genotipo P[8] e sorotipos G1 e G4, porém, mais recentemente o genotipo P[6] tornou-se comum e novas combinações de genotipos passaram a ocorrer no país.

Kang et al. (2002), ao realizarem a epidemiologia molecular das rotavirose em crianças na Índia, entre 1995 e 1998, relataram a genotipagem G em 80%

(101/126) das amostras e genotipagem P em 61% (78/126), sendo os mais freqüentes os genotipos G[1], G[4], G[2], G[9] e G[3], e os genotipos P[4], P[8] e P[6].

No Brasil, Leite et al. (1996) ao analisarem amostras fecais de crianças menores de 5 anos de idade a partir de diversos Estados do Brasil, verificaram genotipos comuns àqueles descritos em outros países, entre eles, G1P[8] (43%); G2P[4] (12%); G3P[8] (6%); G4P[8] (6%). Diferentemente, entretanto, o genotipo G5P[8] foi observado em 12% dos casos. Corroborar este achado a descrição anterior feita por Gouvea et al. (1994), em que o genotipo G5 havia sido detectado em material fecal de crianças. Santos et al. (1998) observaram a ocorrência dos tipos G5, G8 e G10 em 40% de amostras fecais diarreicas de crianças. Por sua vez, Timenetsky et al. (1997) descrevem o encontro em fezes diarreicas de criança, uma amostra que apresentava dualidade de genotipos G5 e G11, este último genotipo até então relatado apenas em suínos.

Com relação à sintomatologia clínica apresentada pelos animais infectados pelos rotavírus, os sinais incluem diarreia, prostração, anorexia, febre e desidratação, o que ocorre principalmente nas primeiras quatro semanas de vida do animal, com período de incubação variando de 18 a 96 horas (MEBUS, 1990).

A mortalidade depende da severidade do quadro de diarreia, do grau de desidratação e da associação com outros agentes (JANKE, 1989).

Os rotavírus demonstram tropismo por enterócitos maduros do epitélio colunar da superfície dos vilos do intestino delgado, os quais tem uma função digestiva e absorptiva, sendo as partículas virais detectáveis no citoplasma, sítio da replicação viral, particularmente nas cisternas do retículo endoplasmático, de onde as partículas se formam por brotamento; a replicação dos rotavírus faz cessar a síntese de DNA, RNA e proteínas nas células infectadas, além de desencadear um aumento na

concentração de cálcio intracelular por intermédio da proteína viral não estrutural NSP4, culminando com a degeneração destas células pela liberação das partículas virais por lise e uma conseqüente esfoliação, acarretando acentuada queda na população destas, o que leva à atrofia dos vilos intestinais; o epitélio assim perdido acaba sendo repostado por enterócitos cubóides e imaturos das criptas da mucosa intestinal, podendo-se, em casos graves de rotavirose, observar-se um epitélio plano no intestino delgado (ESTES, 1996; HALL; JONES; MORGAN, 1992; LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

A conseqüência direta de tão profunda modificação histológica é uma alteração na fisiologia digestiva intestinal: as células da cripta diferem funcionalmente daquelas das vilosidades basicamente em dois aspectos: primeiro, são deficientes em β -galactosidase, denominada também de lactase, uma enzima que tem como substrato a lactose presente no leite, a qual, por sua ação, é degradada a monossacarídeos, os quais podem, então, ser absorvidos; além disso, estas células têm uma função caracteristicamente secretória, principalmente de íons bicarbonato e cloro associados a íons sódio (LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

Uma vez havendo deficiência de β -galactosidase, a lactose não será digerida ou absorvida, passando a acumular-se no intestino grosso, criando, assim, um meio hipertônico em relação ao líquido extra-celular no lúmen intestinal, agravado pela secreção de sódio, cloro e bicarbonato pelas células das criptas então predominantes, o que determina a perda de água no sentido meio extracelular-lúmen, caracterizando-se aqui uma diarreia osmótica (HALL; JONES; MORGAN, 1992; LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

Apesar da descrição deste mecanismo como um dos principais desencadeadores da diarreia, a patofisiologia é complexa, envolvendo também uma

queda de atividade enzimática da borda em escova, dificultando o transporte de glicose e aminoácidos, um aumento da condutância intestinal, traduzido por um aumento do transporte paracelular de fluídos e eletrólitos, que pode parcialmente dissipar a hiperosmolaridade das partes superiores do vilo e a participação do sistema nervoso central (CIARLET; ESTES, 2001; LUNDGREN; SVENSSON, 2001).

Segundo Acha e Szyfres (1986) a porta de entrada para a infecção é a via oral, enquanto que as vias de transmissão incluem fezes, água e alimentos contaminados. Tan e Yap (1997) ressaltaram a importância de moscas como vetores mecânicos dos rotavírus.

Com a introdução de técnicas de confinamento, principalmente em bovinocultura de leite e suinocultura, associado a um manejo inadequado de excretas, houve como consequência uma ascensão nos níveis de contaminação ambiental que pode levar ao aumento da ocorrência de infecções por rotavírus (WOODE, 1978).

A imunização de vacas ou matrizes suínas prenhes com vacinas inativadas é um dos métodos de controle, mas que implica num consumo de colostro e leite, de modo que a IgA secretora tenha atividade na mucosa intestinal (CASTRUCCI et al., 1994).

Ainda com relação a vacinação, Kim et al. (2002) sugerem que pelo menos 2 sorotipos possam ser contemplados numa vacina para prevenção da rotavirose bovina de modo a se obter máxima resposta em termos de anticorpos colostrais, conquanto se incorporem aqueles que sejam predominantes na região.

O potencial zoonótico dos rotavírus foi apontado inicialmente por Mayr (1980), caracterizando-os na ocasião como novas viroses emergentes. A ocorrência de sorotipos tipicamente animais em humanos, e vice-versa, tem sido demonstrada.

Tanigushi et al. (1991) detectaram a presença de um sorotipo predominantemente humano (G8) em amostra bovina proveniente da Tailândia. Gouvea, Santos e Timenetsky (1994a) também puderam observar a presença do sorotipo humano G8 em amostra suína pela prova de PCR.

Nakagomi et al. (1992) verificaram que uma amostra humana (Ro1845, sorotipo G3) proveniente de Israel seria de origem animal.

Gusmão et al. (1994) sugeriram a possibilidade de transmissão interespecies dos rotavírus quando detectaram eletroferótipo similar ao de aves em crianças hospitalizadas com quadro clínico de diarreia na cidade de Belém, Pará.

Segundo Kapikian e Chanock (1996), a transmissão de rotavírus entre diferentes espécies animais constitui-se num evento raro, ainda que certos rotavírus animais compartilham antígenos neutralizantes com rotavírus humanos e que algumas amostras de rotavírus animais possam infectar humanos.

Nakagomi et al. (2003) denotam uma mudança na dinâmica populacional de rotavírus eqüinos, no qual há a emergência do sorotipo G14 em potros com diarreia no Japão, apresentando uma elevada homologia tanto com os sorotipos G3 e G14 descritos anteriormente nos Estados Unidos, sugerindo que as amostras G14 sejam um "reassortant" no qual um típico rotavírus eqüino G3 adquiriu segmento genômico codificador da VP7 de uma amostra G14, bem como o segmento codificador de antígeno de sub-grupo.

Na Coreia, foi descrito recentemente por Lee et al. (2003) a ocorrência de rotavirus caprinos G3P[3], sendo similar àqueles descritos em símios, cães e felinos e excepcionalmente em humanos, entretanto diferindo da amostra italiana isolada G6P6[1], esta última, por apresentar uma combinação genotípica semelhante àquela

bovina, o que provavelmente tenha sido resultante de uma transmissão interespécies.

O encontro de rotavírus do grupo C foi inicialmente descrito em suínos, mas posteriormente verificou-se a infecção em outras espécies, entre elas, bovinos, caninos (OTTO; SCHULZE; HERBST, 1999) e no homem (ESTES, 1996). Aliás, os rotavírus do grupo C foram associados a diversos surtos de diarreia em suínos em na Ásia, Europa e Estados Unidos (KIM et al., 1999).

No tocante ao isolamento viral, Saif (1994) relata que apesar dos rotavírus animais serem menos fastidiosos nas suas necessidades de multiplicação, a rotina de isolamento continua difícil, apesar do uso de células MA-104 (oriunda de rim fetal de macaco Rhesus) e a incorporação de enzimas proteolíticas no meio de manutenção de células inoculadas. São necessárias várias passagens "cegas" para se chegar ao isolamento do vírus e, mesmo assim, o efeito citopático é pouco característico (ROSALES, 2001; YOLKEN; WILDE, 1994).

O diagnóstico das rotaviroses deve ser direto, dada a elevada prevalência de anticorpos contra os vírus entéricos e pelo fato de não haver associação suficientemente discriminativa entre os títulos séricos de anticorpos e proteção para a enfermidade (TORRES-MEDINA; SCHLAFFER; MEBUS, 1985). Outro fator favorável à detecção dos rotavírus é a eliminação de um elevado número de partículas virais no início das manifestações clínicas (BISHOP, 1996; MEBUS, 1990).

Vários testes, incluindo microscopia eletrônica (BISHOP et al., 1973), imunofluorescência e imunomicroscopia eletrônica (BRIDGER; WOODE, 1975), ensaio imunoenzimático (ELLENS; DELEEUW, 1977), radioimunoensaio (CUCKOR; BERRY; BLACKLOW, 1978), co-aglutinação com proteína A do *Staphylococcus*

aureus (DURIGON et al., 1991), contraimuno eletroforese (CANDEIAS; ROSENBERG; RÁCZ, 1978) e reação em cadeia pela polimerase (GOUVEA et al., 1990; TANIGUCHI et al., 1992), e mais recentemente o "real-time" RT-PCR (SCHWARZ et al., 2002), têm sido utilizados para a detecção de rotavírus.

Devido à dificuldade de inicialmente se propagar os rotavírus em cultivos celulares, a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) tornou-se uma importante técnica laboratorial e epidemiológica para a caracterização de amostras de rotavírus, realizada através da extração do RNA viral e observação destes segmentos genômicos, de acordo com a sua mobilidade eletroforética (HERRING et al., 1982).

A principal vantagem da técnica de PAGE reside na possibilidade de detecção de rotavírus pertencentes a quaisquer grupos (ESTES, 1996). Além disso, ela permite reduzir gastos com reagentes imunológicos e produtos químicos empregados em outras técnicas (HERRING et al., 1982). Por outro lado, é relativamente complexa na sua execução, o que dificulta o seu emprego em situações que exijam processamento de um grande número de amostras (JEREZ, 1997). A análise extensiva dos eletroferótipos obtidos de amostras fecais humanas e animais possibilitou várias informações acerca da epidemiologia molecular e da história natural deste vírus, traduzido por um grande polimorfismo genético, mas as tentativas de correlação destes com características biológicas relevantes tem limitado sucesso (GOUVEA; BRANTLY, 1995; NAKAGOMI et al., 2002).

Uma alternativa ao diagnóstico dos rotavírus do grupo A é a ampla utilização da técnica de ELISA, que segundo Beards et al. (1984), é altamente sensível, específica e conveniente na detecção de rotavírus em fezes, porém, como todo teste sorológico, está diretamente relacionada com a qualidade dos anticorpos empregados (GREGORI et al., 2000).

Ellis e Daniels (1988) compararam a microscopia eletrônica e um “kit” comercial de ELISA para a detecção de rotavírus a partir de material fecal de bezerros, cordeiros, leitões e potros, no qual o ELISA foi três vezes mais sensível na identificação da infecção por rotavírus do que a microscopia eletrônica.

Markowska et al. (1996) ao avaliarem diferentes métodos, entre eles ELISA, imunofluorescência, eletromicroscopia e PAGE, para o diagnóstico de infecção por rotavírus em leitões, constataram que o uso do ELISA proporcionou um meio efetivo e eficiente para a detecção deste agente, mas ressaltaram a importância de outras técnicas confirmatórias da presença do vírus.

Beer et al. (1997) verificaram que as provas de PAGE e microscopia eletrônica apresentaram 100% de especificidade na detecção de rotavírus em material fecal de bezerros, embora estas provas sejam menos sensíveis que os ensaios imunoenzimáticos comerciais, que apresentaram sensibilidade variando de 93% a 100% e especificidade de 79% a 100%.

Maes et al. (2003) compararam “kit” de ELISA para a detecção de rotavírus (Pathfinder, Sanofi®) com a prova de RT-PCR para rotavírus bovino do grupo A e obtiveram valores de sensibilidade e especificidade de 78,3% e 67,7%, respectivamente.

Por sua vez, Villegas et al. (2002) consideram a RT-PCR como “gold standard” em relação aos demais testes para a detecção de rotavírus, obtendo, ao se comparar com o teste de ELISA utilizando anticorpo conjugado a avidina, uma sensibilidade de 98,4%, especificidade de 100%, valor preditivo negativo de 97,3%, valor preditivo positivo de 100%. Ressaltam também que a performance de um ELISA é satisfatória desde que haja pelo menos 10^4 partículas virais/mL.

Apesar da elevada disponibilidade de métodos diagnósticos que permitam a mensuração de frequências e estudos da cadeia epidemiológica dos rotavírus, ainda que fundamentais, eles, entretanto não são suficientes para a complexa tarefa de definir a variabilidade molecular e a relação entre diferentes amostras, o que é desejável no sentido de prover informações mais detalhadas acerca da origem e distribuição geográfica de determinadas amostras, suas vias de transmissão, e estudos vacinais. Para tanto, o método de reconstrução genealógica mais largamente utilizado em virologia é a máxima parcimônia, na qual se assume que cada sítio ou posição de nucleotídeo é um caracter, sendo o critério de otimização o comprimento total da árvore, ou seja, a árvore de menor somatória de comprimentos de ramos é a verdadeira (BROWN, 1994).

A máxima parcimônia tem por princípio a redução do conjunto de dados pela eliminação de todos os caracteres não variáveis entre diferentes seqüências e dos caracteres que variam apenas em uma das seqüências, sendo considerados como sítios de parcimônia informativos aqueles nos quais dois ou mais resíduos estão representados cada um mais de uma vez no conjunto de dados, sendo, portanto, assumido um modelo evolutivo implícito no qual uma substituição é mais provável do que duas, sendo selecionada a árvore com topologia que minimiza o número de substituições nestes sítios, ou seja, a árvore que requer o menor número de mudanças entre caracteres (BROWN, 1994; MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001).

Em máxima parcimônia, há dois grupos de algoritmos para a obtenção de árvores: exatos e heurísticos. Os algoritmos exatos por busca exaustiva enumeram todas as possíveis árvores estritamente bifurcadas para um dado número de seqüências em análise, testando as seqüências em todas as posições possíveis até o encontro das árvores de parcimônia, mas, dado o tempo computacional consumido

neste processo, desenvolveu-se um algoritmo alternativo pelo qual as árvores sub-ótimas, ou seja, aquelas de maior número de passos, são eliminadas do conjunto de árvores, algoritmo este que recebeu o nome de “branch-and-bound”, o qual acelera sensivelmente a obtenção de árvores (MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001).

O segundo grupo de algoritmos utilizado em máxima parcimônia são os algoritmos heurísticos, os quais, de um modo genérico, tem por princípio eliminar do cálculo de comprimento de árvores aquelas de baixa probabilidade de serem de máxima parcimônia, um procedimento simplificado e eficiente que sensivelmente diminui o tempo computacional gasto no processo, mas que não garante a solução exata de uma determinada genealogia (MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001).

Para testar a confiabilidade de cada ramo que compõe uma dada árvore, o teste estatístico mais largamente aplicado é o “bootstrapping”, onde um conjunto de dados replicados é gerado por amostragem aleatória com reposição a partir da matriz de caracteres original criando novas matrizes de caracteres do mesmo tamanho da original, registrando-se a frequência de ocorrência de um dado ramo como o valor de “bootstrap” a ele referente (HILLIS; MABLE; MORITZ, 1996).

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

- a) Pesquisar a presença de rotavírus a partir de amostras fecais diarréicas de suínos, em granjas produtoras localizadas em diversos municípios no Estado de São Paulo, utilizando as técnicas de PAGE e ensaio imunoenzimático (ELISA).
- b) Avaliar a concordância entre as provas de PAGE e ELISA na detecção de rotavírus a partir de amostras fecais diarréicas de suínos.
- c) Caracterizar as amostras positivas para rotavírus em seus genótipos G e P, utilizando a técnica de Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR).
- d) Determinar a identidade média de nucleotídeos dos genes codificadores das proteínas estruturais VP4 e VP7 a partir de seqüenciamento do DNA correspondente aos mesmos.
- e) Propor genealogias consoante os genótipos P e G para os rotavírus detectados.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O fluxo geral de atividades deste estudo está esquematizado na figura 2. Resumidamente, as amostras fecais de leitões foram triadas quanto a presença de rotavírus pelas provas de PAGE e ELISA. Se positiva em pelo menos uma destas provas, cada amostra foi então submetida à genotipagem G e P utilizando-se a prova de RT-PCR. Algumas amostras oriundas destas genotipagens foram seqüenciadas e serviram como base para inferências genealógicas. Paralelamente, os produtores rurais envolvidos no trabalho foram informados quanto ao diagnóstico e receberam orientações técnicas a respeito das rotaviroses.

Figura 2 – Resumo esquemático das atividades do estudo "Ocorrência e caracterização de genótipos de rotavírus a partir de material fecal de leitões com diarreia, provenientes de diversas propriedades de criação de suínos, localizadas no Estado de São Paulo" - São Paulo - 2003

4.1 AMOSTRAS FECAIS

Foram utilizadas 144 amostras de fezes de leitões com quadro clínico de diarreia, colhidas entre os anos de 1999 a 2001 em granjas comerciais, provenientes dos municípios de Bragança Paulista, Campinas, Capivari, Ibiúna, Itaberá, Itú, Pedra Bela, Piedade, Mogi das Cruzes e São José dos Campos, como ilustra a figura 3.

Figura 3 - Localização dos municípios dos quais foram oriundas as amostras suínas utilizadas no estudo de genotipagem para rotavírus - São Paulo - 2003

4.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A pesquisa de rotavírus nas amostras de material fecal foi realizada segundo Herring et al. (1982) utilizando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida.

4.2.1 Preparo do material fecal para a PAGE

Diluíram-se aproximadamente 5 gramas de cada amostra fecal (previamente mantida sob refrigeração ou congelamento) em tampão TRIS-HCl 0,1 M pH 7,3, em proporção de 1:5 (p/v) em tubos de polipropileno contendo em seu interior algumas pérolas de vidro e identificados individualmente. Homogeneizou-se este material em agitador de tubos tipo “vórtex” por 3 vezes em intervalos de 10 minutos. O material foi então centrifugado a 11.400 g durante 30 minutos. O sobrenadante desta centrifugação foi colhido e tratado com igual volume de Freon® (Triclorofluoretano, DuPont). Após homogeneização, todo o material foi centrifugado por 15 minutos a 1.000 g. O sobrenadante foi separado para a extração do RNA viral ou congelado a -80°C para posterior processamento.

4.2.2 Extração do RNA viral para a PAGE

A extração do RNA viral para a prova de PAGE consistiu em:

1. Tomar 0,4mL da suspensão fecal tratada (item 4.2.1) e adicionar 40 μL de SDS, este último previamente diluído à concentração de 10% (p/v) em água bidestilada.
2. Incubar por 30 minutos em banho-maria a 37°C .
3. Adicionar 0,2mL de fenol destilado e 0,2mL de clorofórmio.

4. Incubar em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 15 minutos agitando a cada 5 minutos em agitador de tubos tipo “vórtex”.
5. Centrifugar a 1.000 g por 10 minutos.
6. Transferir o sobrenadante para tubo tipo “eppendorf” e adicionar 40µL de NaCl, previamente diluído à concentração de 20% (p/v) em água bidestilada.
7. Adicionar a cada tubo 1,0mL de etanol.
8. Incubar a -20°C por 18 horas.
9. Centrifugar a 12.000 g por 30 minutos.
10. Desprezar o sobrenadante.
11. Deixar os tubos secando, invertidos sobre um papel de filtro, visando o esgotamento de todo o sobrenadante.
12. Ressuspender o sedimento em 15 µL do dissociador da amostra (anexo 1.1).
13. Incubar 30 minutos em banho-maria a 37°C.
14. Adicionar 15 µL de cada amostra nas canaletas da placa de gel de poliacrilamida (item 4.2.4.7).

4.2.3 Preparo do gel de poliacrilamida

1. Em posição horizontal, colocar os espaçadores sobre uma das placas, sobrepondo a outra restante.
2. Prender com garras metálicas e, a seguir, promover o correto ajuste das peças.
3. Vedar as extremidades da placa com ágar fundido a 2% (p/v em água bidestilada).
4. Colocar o conjunto em posição vertical, apoiado sobre as garras, e mantendo um correto nível horizontal no espaço destinado ao gel.

5. Adicionar o gel de corrida a 7,5% (anexo 1.6) até o nível ligeiramente inferior à extremidade do pente e aguardar a polimerização.
6. Adicionar o gel de empilhamento a 3,5% (anexo 1.6), colocar o pente, e aguardar a polimerização.

4.2.4 Condições de corrida eletroforética

1. Soltar as garras da parte inferior do conjunto, retirando a vedação e o espaçador da base.
2. Fixar as placas montadas ao suporte de eletroforese, com o auxílio das garras, evitando a formação de bolhas. A face com a placa de vidro recortada deve ficar encostada ao suporte, abaixo do nível superior do suporte de eletroforese.
3. Vedar o contato da placa com o suporte, utilizando ágar fundido a 2% (p/v em água bidestilada).
4. Encher os reservatórios com tampão de corrida (anexo 1.8).
6. Retirar cuidadosamente o pente, fazendo movimento firme e vertical.
7. Colocar com o auxílio de uma micro-seringa, 15 μ L de cada amostra a ser testada na canaleta correspondente (item 4.2.2.14).
8. Conectar os "plugs" da fonte de tensão e regular a corrente em 20 mA.
9. O tempo de corrida eletroforética é de aproximadamente 2 horas. Adotou-se, como medida geral, esperar que a linha azul que se forma durante a corrida, decorrente da presença do azul de bromofenol, percorra toda a placa, para então finalizar a eletroforese dentro de 30 minutos.

4.2.5 Coloração com nitrato de prata

1. Retirar as placas do suporte.
2. Retirar uma das placas de vidro.
3. Eliminar o gel de empilhamento e referendar o gel com um pequeno corte na sua margem superior esquerda.
4. Fazer deslizar o gel pela placa de vidro, lavando a placa com água Milli Q[®], num recipiente plástico.
5. Lavar o gel 3 vezes com água Milli Q[®].
6. Adicionar a solução de etanol-ácido acético (anexo 1.9), agitar por 30 minutos em agitador tipo “kleine”.
7. Desprezar a solução anterior.
8. Imergir o gel em solução de nitrato de prata 0,011M, e mantê-lo sob agitação por 60 minutos em agitador tipo “kleine”.
9. Desprezar a solução anterior.
10. Lavar o gel 3 vezes com água Milli Q[®] para remover todo o resíduo de nitrato de prata e água.
11. Adicionar a solução reveladora (anexo 1.10), controlando o aparecimento das bandas.
12. Uma vez observadas as bandas, remover a solução reveladora, e adicionar ao gel o ácido acético previamente diluído com água Milli Q[®] a 5% (v/v), e aguardar 15 minutos.
13. Lavar o gel 3 vezes com água Milli Q[®]. Remover a água residual.
14. Adicionar etanol a 10% (v/v em água Milli Q[®]) ao gel.
15. Examinar o gel com auxílio de transiluminador.

4.2.6 Interpretação dos resultados

Consideraram-se positivas as amostras que apresentaram disposição de bandas na migração eletroforética semelhante à amostra padrão NCDV, sendo posteriormente submetidas a genotipagem, enquanto que as negativas foram descartadas, se e somente se, fossem também negativas pela prova de ELISA.

4.3 REAÇÃO DE ELISA

Utilizou-se 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), segundo metodologia descrita por Gregori et al. (2000).

4.3.1 Preparo da amostra fecal para a reação de ELISA

Foram feitas suspensões a 10% em PBS 0,01M pH 7,4, das amostras fecais e posteriormente clarificadas por centrifugação a 2.000 g por 15 minutos a 4°C.

4.3.2 Condições de teste

1) Sensibilizar a microplaca (Nunc-Maxisorp[®]) com anticorpo de captura em concentração de 10 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6 (anexo 2.1), e incubá-la a 4°C por 18 horas.

- 2) Lavar cada cavidade da microplaca com 250µL de tampão de lavagem (anexo 2.2), por 3 vezes consecutivas.
- 3) Bloquear a placa através da adição de 200µL por cavidade de tampão carbonato-bicarbonato (anexo 2.1) acrescido de leite em pó desnatado a 10% (p/v), e mantê-la a 37°C por 1 hora
- 4) Lavar cada cavidade com 250µL de tampão de lavagem (anexo 2.2), por 3 vezes consecutivas.
- 5) Adicionar as amostras fecais tratadas (item 4.3.1) e diluídas a 1:4 (v/v) em tampão de lavagem, acrescido de leite em pó desnatado a 5% (p/v), em volume de 100µL por cavidade, em duplicata. Incubar a microplaca em estufa a 37°C por 1 hora.
- 6) Lavar cada cavidade com 250µL de tampão de lavagem (anexo 2.2), por 3 vezes consecutivas.
- 7) Diluir o anticorpo revelador a 1:100, em tampão de lavagem (anexo 2.2), acrescido de leite em pó desnatado a 5% (p/v), e adicioná-lo em volume de 100µL por cavidade. Incubar a microplaca em estufa a 37°C por 1 hora.
- 8) Lavar cada cavidade com 250µL de tampão de lavagem (anexo 2.2), por 3 vezes consecutivas.
- 9) Adicionar o conjugado (Sigma® A-61543) na diluição de 1:1000 em tampão de lavagem (anexo 2.2), acrescido de leite em pó desnatado a 5% (p/v), em volume de 100µL por cavidade. Incubar a microplaca em estufa a 37°C por 1 hora.
- 10) Lavar cada cavidade com 250µL de tampão de lavagem (anexo 2.2), por 3 vezes consecutivas.
- 11) Adicionar a solução cromógena (anexo 2.3) em volume de 100 µL por cavidade.
- 12) Após 10 minutos, adicionar a cada cavidade 50µL de HCl 1N, e proceder a leitura da reação.

As reações foram lidas em aparelho leitor de microplacas Labysystem® modelo Multiskan plus com filtro de 492 nm, utilizando-se a amostra NCDV de rotavírus como controle. Os valores de absorvância obtidos foram expressos através da média aritmética da duplicata de cada diluição. As amostras positivas foram submetidas à genotipagem, enquanto que as negativas foram descartadas, se e somente se, fossem também negativas pela prova de PAGE.

4.4 CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DE PAGE E ELISA

Os valores de sensibilidade relativa, especificidade relativa, valores preditivos positivo e negativo, o valor de concordância observado, o índice de Younden, e o teste Kappa (MARTIN et al., 1987), a um intervalo de confiança de 95%, entre ELISA e PAGE foram calculados através do software WinEpiscope v. 2.0 (© 2001, Blas, Ortega, Frankena, Noordhuizen & Thrusfield).

4.5 REAÇÃO DE RT-PCR

Para a genotipagem das amostras positivas foram utilizadas metodologias descritas por Das et al. (1994), Gentsch et al. (1992), Gouvea, Santos e Timenetsky (1994a,b), com modificações nas etapas de extração do ácido nucléico viral, fazendo-se substituir o tratamento da amostra com isotiocianato de guanidina, hidroxiapatita e brometo de cetiltrimetilamônio pelo reagente Trizol® (Invitrogen™) e nas etapas de transcrição reversa e primeira amplificação, utilizando-se reações distintas ao invés de uma única. Foram testadas as amostras com diferentes conjuntos de primers dirigidos aos genotipos G e P mais comumente encontrados em animais e em humanos (anexo 3), como esquematizado nas figuras 4, 5 e 6.

Foram refeitas as reações em que se observou a amplificação de segmentos para dois ou mais genótipos mediante o emprego de primer único, com o intuito de confirmar os achados. A água empregada em todas as reações e diluições (itens 4.5 e 4.6) foi obtida em equipamento Milli Q® e autoclavada a 127°C por 1 hora, antes do seu emprego.

Figura 4 - Resumo esquemático do método adotado para caracterização por RT-PCR de genótipos G e P de rotavírus - São Paulo - 2003

Figura 5 - Resumo esquemático do método adotado para caracterização por RT-PCR de genótipos P de rotavírus - São Paulo - 2003. Adaptado de Gentsch et al. (1992) e Gouvea, Santos e Timenetsky (1994b)

Figura 6 - Resumo esquemático do método adotado para caracterização por RT-PCR de genótipos G de rotavírus, São Paulo, 2003. Adaptado de Das et al. (1994) e Gouvea, Santos e Timenetsky (1994a)

4.5.1 Extração de RNA para reação de transcrição reversa

- 1) Preparar suspensões das amostras fecais a 10% (p/v) em PBS 0,01M pH 7,4 e posteriormente clarificar por centrifugação a 2.000 g por 15 minutos a 4°C.
- 2) Homogeneizar 750µL de Trizol[®] e 250µL de suspensão de amostra, e incubar por 5 minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).
- 3) Adicionar 200µL de clorofórmio e homogeneizar em vórtex e incubar por 15 minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).
- 4) Centrifugar a 12.000 g por 15 minutos a 4°C e transferir a fase aquosa para outro tubo.
- 5) Adicionar 500µL de álcool isopropílico e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).
- 6) Centrifugar a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. Desprezar o sobrenadante.
- 7) Adicionar 1 mL etanol 75% (v/v em água).
- 8) Homogeneizar em agitador de tubos tipo “vórtex”.
- 9) Centrifugar a 7500 g por 5 minutos a 4°C.
- 10) Secar o sedimento mantendo o tubo em banho-maria seco a 95°C, e adicionar 50µL de água tratada com DEPC (Invitrogen[™]).
- 11) Incubar o tubo a 56°C por 10 minutos. Conservar a -20°C até o momento do uso.

4.5.2 Reação de Transcrição Reversa

- 1) Misturar 5,6µL da amostra de RNA extraído com 1,4µL DMSO, desnaturar a 97°C por 5 minutos; em seguida, transferir para banho de gelo, permanecendo neste por mais 5 minutos.

2) Adicionar a mistura RNA-DMSO (7µL) à solução “RT-mix”, que por sua vez é composta por 1x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1 pmol/µL de cada primer (Con2 e Con3, para a genotipagem P; Beg9, End9, End9UK, e End9CRW8, para a genotipagem G) e 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para um volume final de reação de 20µL; manter a 42°C por 1 hora.

4.5.3 Primeira Amplificação

1) Misturar 5µL do produto obtido (item 4.5.2.2) à solução “PCR-mix”, que por sua vez é composta por 1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada primer (Con2 e Con3, para a genotipagem P; Beg9, End9, End9UK, e End9CRW8, para a genotipagem G), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), água q.s.p. 50µL; submeter a 30 ciclos de 94°C/1 minuto, 42°C/2 minutos, 72°C/1minuto, seguido de 72°C/10 minutos para extensão final.

4.5.4 Segunda amplificação

1) Misturar 5µL de DNA amplificado na etapa anterior (item 4.5.3) à solução “PCR-mix”, que por sua vez é composta por 1x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada primer (Con2, pUK, pNCDV, pGOTT, pB223, e pOSU para a genotipagem P “animal”; sBeg9, FT5, ET10, DT6, BT11, e HT8 para genotipagem G “animal”; Con3, 1T-1, 2T-1, 3T-1, 4T-1, e 5T-1 para genotipagem P “humana”; 9Con1, 9T1-1, 9T1-2, 9T3P, 9T4, 9T9B para genotipagem G “humana”), 1,5 mM de MgCl₂, 1,25U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen™), água q.s.p. 50µL, e submeter a 25 ciclos de 94°C/1 minuto, 55°C/2 minutos, 72°C/1 minuto (para genotipagem G e P “animal”) ou

30 ciclos de 94°C/1 minuto, 42°C/2 minutos, 72°C/1 minuto (para genotipagem G “humana”) ou ainda 25 ciclos de 94°C/1 minuto, 50°C/2 minutos, 72°C/1 minuto (para genotipagem P “humana”), seguindo-se um passo final de 72°C/10 minutos para extensão final.

2) Em seguida, 10µL do produto oriundo da 2ª amplificação 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 0,5 µg/mL de brometo de etídio por 10 minutos. Consideram-se positivas as amostras que apresentaram no gel segmentos amplificados de tamanho correspondente àqueles descritos (anexo 3), tendo como referência a inclusão de 10µL de DNA ladder 100bp (Invitrogen™) e utilizando-se como controles positivos as amostras NCDV, UK, KK3, SA11, OSU, ST3, DS1, e RV4 e como negativo a água empregada em diversas etapas das reações (itens 4.5.3 e 4.5.4).

4.6 ANÁLISE POR SEQÜENCIAMENTO

Foram realizadas reações de seqüenciamento a partir dos produtos de “nested-PCR” de amostras positivas em seus genotipos P e G “animais”. De cada município, foram selecionadas amostras que representassem cada um dos genotipos encontrados, de modo a se observar a sua diversidade molecular de genotipos animais.

O fluxo de atividades para a análise de seqüenciamento está esquematicamente exposto na figura 7.

Figura 7 - Resumo esquemático para a análise de seqüenciamento de rotavírus - São Paulo - 2003

4.6.1 Extração, quantificação de DNA e reação de seqüenciamento

- 1) Observar a banda com fragmento de tamanho esperado em gel de agarose a 2% (p/v) em TRIS-borato 0,045M; EDTA 0,001M pH 8,0, recortando-a com lâmina de bisturi não utilizada anteriormente (aproximadamente 400 mg de material).
- 2) Utilizar o “kit” *Concert gel extraction system*[®] (Gibco n. 11456), de acordo com as instruções do fabricante, para a extração do DNA a partir do gel.
- 3) Fazer um gel de agarose a 2% (p/v em TRIS-borato 0,045M; EDTA 0,001M pH 8,0) para a quantificação de DNA, colocando 4 µL de DNA por canaleta. Usar como padrão o *low mass DNA ladder*[®] (GIBCO n. 10068-13). Corar o gel em banho de água com 0,5 µg/mL de brometo de etídio por 10 minutos.

- 4) Comparar visualmente as intensidades de banda obtidas do DNA purificado com aquelas do padrão. Através da tabela fornecida pelo fabricante do *low mass DNA ladder*[®], determinar a concentração de DNA (em nanogramas) da amostra.
- 5) Misturar 10 ng de DNA extraído com 4µL de *Terminator Ready Reaction Mix* (Big Dye[®] v.3.0); 4µL de Tampão Save Money 5X (400 mM Tris-HCl / 10mM MgCl₂ pH9.0); 4 picomols do primer (senso ou anti-senso); e água q.s.p. 20µL.
- 6) Submeter a amostra ao seguinte programa do termociclador: 35 ciclos de 96°C/30s; rampa 0,7°C/s para 50°C; 50°C/15s; rampa 0,7°C/s para 50°C; 60°C/4 min; rampa 0,7°C/s para 50°C. Ao final manter a 4°C até a próxima etapa.

4.6.2 Precipitação com isopropanol e etanol

- 1) Pipetar 80µL de isopropanol a 75% (v/v em água) no tubo de 0,2mL que contém a amostra de DNA (item 4.5.1.6).
- 2) Homogeneizar e manter em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 20 minutos.
- 3) Centrifugar 12.000 g por 25 minutos em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).
- 4) Remover todo isopropanol com pipeta.
- 5) Adicionar 250µL de etanol 70% (v/v em água) .
- 6) Agitar o tubo em agitador tipo “vórtex” e centrifugar a 12.000 g por 5 minutos em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C).
- 7) Remover todo etanol com pipeta.
- 8) Secar as amostras a 95°C por 4 a 5 minutos.
- 9) Armazenar as amostras em freezer (-20°C) até o momento de seqüenciar.

4.6.3 Preparo da amostra para seqüenciamento

- 1) Fazer a ressuspensão da amostra precipitada colocando 15 µL TSR (Template Suppression Reagent n. 401674 - Applied Biosystems®) por tubo.
- 2) Homogeneizar e transferir para tubos 0,5mL de seqüenciamento e fechá-los com tampa Septa®.
- 3) Manter os tubos a 97°C por 5 minutos, e em seguida, mantê-los em banho de gelo até o momento de seqüenciar.
- 4) Realizar o seqüenciamento mediante o protocolo contido no manual técnico do equipamento ABI-310 – Applied Biosystems®.

4.7 Análise das seqüências de nucleotídeos

A partir das seqüências de nucleotídeos obtidas com o equipamento ABI-310, aquelas oriundas dos primers anti-senso foram transformadas para o seu reverso e complemento, e realizadas correções nos cromatogramas, utilizando-se o software Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty Ltd). Em seguida, foi feita a conversão do formato de arquivo ABI para o formato FASTA, utilizando-se o software Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall), e realizado o alinhamento através do software ClustalW v. 1.4 das seqüências senso e anti-senso e definição de consenso.

Posteriormente foram verificadas as consistências dos achados através do serviço Blast-n do GenBank, e neste último foram importadas as diversas seqüências de rotavírus codificantes dos genotipos P e G, junto ao programa Bioedit, de modo a se realizar o alinhamento entre as recém-obtidas e aquelas já descritas, mediante o uso do software ClustalW, salvando-o em arquivo com formato

FAS. As seqüências foram cortadas em suas extremidades, desde que apresentassem nucleotídeos presentes em todas.

A plausibilidade biológica do alinhamento de nucleotídeos foi aferida mediante ajuste dos "frames" de tradução (1, 2 e 3) das seqüências (geradas e importadas) com o software BioEdit, e o alinhamento destas utilizando agora sua composição em aminoácidos. O cálculo da matriz de identidade de nucleotídeos foi realizado através do software BioEdit.

O arquivo FASTA referente a região de alinhamento foi aberto e convertido para o formato MEG utilizando-se o programa MEGA (© 2001, Kumar, Tamura, Jakobsen & Nei), e realizadas as árvores genealógicas G e P utilizando-se o método de máxima parcimônia, com algoritmo "branch-and-bound". Cada ramo foi aferido com procedimento estatístico de "Bootstrap", com 2.000 repetições.

As seqüências de amostras obtidas através do GenBank e utilizadas tanto nos alinhamentos como na genealogia dos genotipos P foram as seguintes ("accession number"/amostra): gi 349064 (Po/TRF41/P7); gi 333323 (Po/YM/P7); gi 393327 (Bo/A5/P1); gi 11907979 (Po/8425/P5); gi 4678974 (Po/S8/P8); gi 393328 (Bo/B223/P11); gi 507317 (Hu/ST3/P6); gi 333315 (Po/GOTT/P6). As amostras de rotavírus contendo a notação "Po" são de origem suína, "Bo" de origem bovina, e "Hu" de origem de humana.

As seqüências de amostras obtidas através do GenBank e utilizadas tanto nos alinhamentos como na genealogia dos genotipos G foram as seguintes ("accession number"/amostra): gi 529553 (Po/A34/G5); gi 529543 (Po/A46/G5); gi 529551 (Po/C134/G5); gi 61856 (Po/OSU/G5); gi 1016801 (Po/P343/G10);

gi 222525 (Bo/A44/G10); gi 333829 (Bo/B11/G10); gi 58737 (Bo/B223/G10);
gi 6118544 (Po/ICB2185/G9); gi 516630 (Po/YM/G11); gi 61859 (Po/GOTT/G4).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Dentre as 144 amostras fecais diarréicas de leitões testadas, obteve-se 24 (16,66%) amostras positivas por PAGE. Estas amostras foram, então, separadas para a elaboração da reação de genotipagem, e encontram-se descritas no quadro 1.

5.2 REAÇÃO DE ELISA

Dentre as 144 amostras fecais diarréicas de leitões testadas, obteve-se 39 (27,08%) amostras positivas por ELISA. Estas amostras foram, então, separadas para a elaboração da reação de genotipagem, e encontram-se descritas no quadro 1.

5.3 CONCORDÂNCIA RELATIVA ENTRE O ELISA E PAGE

Na tabela 1 estão apresentados os resultados nas provas de PAGE e ELISA, a partir de 144 amostras fecais diarréicas de leitões. Tomando-se como referência a prova de PAGE, obteve-se uma sensibilidade relativa do ELISA de 83,33%; especificidade relativa de 84,16%; valor preditivo positivo de 51,28%; valor preditivo negativo de 96,19%; índice de Younden de 0,675, e valor Kappa de 0,54.

Tabela 1 – Classificação das amostras fecais diarréicas de leitões segundo as provas de ELISA e PAGE - São Paulo - 2003

<i>ELISA</i>	<i>PAGE</i>		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	20	19	39
Negativo	4	101	105
Total	24	120	144

5.4 REAÇÃO DE RT-PCR

Foram triadas 43 amostras fecais positivas para rotavírus por PAGE e/ou ELISA, e a partir destas procederam-se reações de genotipagem G e P, como consta no quadro 1. Destas, em 2 amostras não foi possível a tipificação em quaisquer genotipos.

Com relação à genotipagem G animal, observou-se a ocorrência de genotipos G[5], G[6] e G[10], respectivamente em 21, 2, e 17 das 43 amostras testadas. Foi encontrada a combinação de genotipos G[5] + G[10], em 8 amostras (8/43). Em 11 amostras (11/43) não foi obtida a tipificação G "animal", como consta na figura 8.

Com relação ao genotipo G "humano", observou-se a ocorrência dos genotipos G[2], G[3] e G[4] respectivamente em 3, 13, e 18 amostras testadas. Foram detectadas as seguintes combinações de genotipos: G[2] + G[3], em 1 amostra (1/43); G[3] + G[4], em 4 amostras (4/43); e G[2] + G[3] + G[4], em 2 amostras (2/43). Não foi obtida a tipificação em 18 amostras (18/43), como consta na figura 9.

Na genotipagem P "animal", 16 amostras não foram tipificadas (16/43). Observou-se também a ocorrência dos genótipos P[1], P[6] e P[7], respectivamente em 8, 18, e 9 amostras das 43 testadas. Foram detectadas as seguintes combinações de genótipos: P[1]+P[6], em 2 amostras (2/43); P[6]+P[7], em 4 amostras (4/43); e P[1]+P[6]+P[7] em 1 amostra (1/43), como consta na figura 10.

Nas tabelas 2 e 3 estão apresentados os resultados da classificação das amostras fecais de leitões segundo a prova de RT-PCR, utilizando-se genotipagem G e P "animal", e G e P "humana", respectivamente.

Nas reações de genotipagem P "humana", observou-se apenas o genótipo P[6] em 28 amostras. As demais, em número de 15, não foram tipificáveis, como consta na figura 11. Observou-se que houve concordância em 16 amostras (16/43) que foram genotipadas unicamente como P[6] tanto com primers "humanos" e "animais", e analogamente em 9 amostras negativas (9/43) para P[6] com primers "humanos" e "animais".

ORDEM	ORIGEM	PAGE	ELISA	GA	GH	PA	PH
1	PEDRA BELA	NEGATIVO	POSITIVO	NT	G[4]	NT	P[6]
2	CAMPINAS 1	POSITIVO	POSITIVO	G[10]	G[4]	NT	P[6]
3	CAMPINAS 1	NEGATIVO	POSITIVO	G[10]	NT	NT	NT
4	CAMPINAS 1	NEGATIVO	POSITIVO	G[5] G[10]	G[4]	P[6] P[7]	P[6]
5	CAMPINAS 1	POSITIVO	POSITIVO	G[5] G[10]	G[3] G[4]	P[6] P[7]	P[6]
6	CAMPINAS 1	POSITIVO	POSITIVO	G[5] G[10]	G[2] G[3] G[4]	P[6] P[7]	P[6]
7	CAMPINAS 1	POSITIVO	POSITIVO	G[5] G[10]	G[3]	P[7]	P[6]
8	CAMPINAS 1	POSITIVO	POSITIVO	G[5] G[10]	G[3] G[4]	P[6]	P[6]
9	CAMPINAS 1	POSITIVO	POSITIVO	G[10]	G[4]	P[7]	NT
10	CAMPINAS 1	POSITIVO	POSITIVO	G[10]	G[2] G[3] G[4]	P[6] P[7]	P[6]
11	CAMPINAS 1	NEGATIVO	POSITIVO	G[10]	G[3] G[4]	P[6]	P[6]
12	CAMPINAS 1	NEGATIVO	POSITIVO	G[10]	G[4]	NT	NT
13	CAMPINAS 1	NEGATIVO	POSITIVO	G[5]	NT	NT	NT
14	CAMPINAS 2	NEGATIVO	POSITIVO	G[10]	NT	P[1]	NT
15	ITABERA	NEGATIVO	POSITIVO	G[5]	NT	NT	NT
16	ITABERA	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	NT	NT	NT
17	ITABERA	POSITIVO	NEGATIVO	G[5]	NT	P[1]	P[6]
18	ITABERA	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	NT
19	ITABERA	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	G[4]	P[6]	P[6]
20	ITABERA	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	NT	NT
21	ITU 1	NEGATIVO	POSITIVO	G[5]	NT	NT	P[6]
22	ITU 1	NEGATIVO	POSITIVO	G[5] G[10]	G[3]	NT	P[6]
23	ITU 1	NEGATIVO	POSITIVO	NT	G[4]	P[6]	P[6]
24	ITU 1	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	NT	P[6]	P[6]
25	ITU 1	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	P[6]	NT
26	ITU 2	POSITIVO	NEGATIVO	NT	NT	NT	NT
27	ITU 2	POSITIVO	NEGATIVO	NT	G[3]	NT	P[6]
28	ITU 2	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	P[1]	P[6]
29	ITU 2	POSITIVO	NEGATIVO	G[10]	G[3]	P[1]	P[6]
30	ITU 3	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	G[4]	P[6]	P[6]
31	ITU 4	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	G[4]	NT	P[6]
32	ITU 5	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	G[4]	P[6]	P[6]
33	ITU 6	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	NT	P[6]	P[6]
34	PIEDADE	NEGATIVO	POSITIVO	NT	NT	P[1]	NT
35	PIEDADE	NEGATIVO	POSITIVO	G[10]	NT	NT	NT
36	PIEDADE	NEGATIVO	POSITIVO	G[5] G[10]	G[2] G[3]	P[1] P[6]	P[6]
37	PIEDADE	NEGATIVO	POSITIVO	NT	G[3]	P[1] P[6] P[7]	P[6]
38	PIEDADE	NEGATIVO	POSITIVO	G[5] G[10]	G[3]	P[1] P[6]	P[6]
39	S J CAMPOS	POSITIVO	POSITIVO	NT	NT	P[7]	P[6]
40	BRAGANÇA	POSITIVO	POSITIVO	G[6]	G[3] G[4]	P[6]	NT
41	IBIÚNA	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	NT	P[7]	NT
42	CAPIVARI	POSITIVO	POSITIVO	G[6]	G[4]	P[6]	P[6]
43	MOGI DAS CRUZES	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	G[4]	NT	P[6]

Quadro 1 – Classificação das amostras fecais diarreicas de leitões oriundas de diversos municípios do Estado de São Paulo, segundo as provas de PAGE, ELISA, e PCR (genotipos G e P) - São Paulo - 2003

Nota: Caso a cidade de origem seja seguida de número significa que as amostras são oriundas de diferentes propriedades. GA significa os resultados oriundos da genotipagem G "animal"; GH, por sua vez, da genotipagem G "humana"; e analogamente para PA e PH. NT significa amostra não tipificada.

Figura 8 – Resultados da genotipagem G "animal" em amostras fecais diarreicas de leitões, provenientes do Estado de São Paulo - São Paulo - 2003

Figura 9 – Resultados da genotipagem G "humana" em amostras fecais diarreicas de leitões, provenientes do Estado de São Paulo - São Paulo - 2003

Figura 10 – Resultados da genotipagem P "animal" em amostras fecais diarréicas de leitões, provenientes do Estado de São Paulo - São Paulo - 2003

Figura 11 – Resultados da genotipagem P "humana" em amostras fecais diarréicas de leitões, provenientes do Estado de São Paulo - São Paulo - 2003

Tabela 2 – Classificação das amostras fecais diarréicas de leitões segundo a prova de RT-PCR, utilizando-se genotipagem G e P "animal" - São Paulo - 2003

<i>Genotipo(s) G</i>	<i>Genotipo(s) P</i>						NT	TOTAL
	P[1]	P[6]	P[7]	P[1] + P[6]	P[6]+P[7]	P[1]+P[6]+P[7]		
G[5]	1	5	1				6	13
G[6]		2						2
G [10]	2	1	1		1		2	7
G[5] +G[10]		1	1	2	3		3	10
NT	2	2	1			1	5	11
TOTAL	5	11	4	2	4	1	16	43

Nota: NT significa "não tipificável"

Tabela 3 – Classificação das amostras fecais diarréicas de leitões segundo a prova de RT-PCR,utilizando-se genotipagem G e P "humana" - São Paulo - 2003

<i>Genotipo(s) G</i>	<i>Genotipo(s) P</i>		
	P[6]	NT	TOTAL
G[2]			
G[3]	6		6
G [4]	10	2	12
G[2]+G[3]	1		1
G[3]+G[4]	3	1	4
G[2]+G[3] + G[4]	2		2
NT	6	12	18
TOTAL	28	15	43

Nota: NT significa "não tipificável"

5.5 REAÇÃO DE SEQÜENCIAMENTO E GENEALOGIA

Foram submetidas 25 amostras à reação de seqüenciamento e destas resultaram 14 seqüências viáveis, as quais estão descritas no quadro 2.

ORDEM*	IDENTIFICAÇÃO	ORIGEM	PAGE	ELISA	GA	PA
14	55P1A	CAMPINAS	NEGATIVO	POSITIVO	NS	P[1]
6	28P6A	CAMPINAS	POSITIVO	POSITIVO	NS	P[6]
19	49P6A	ITABERA	POSITIVO	POSITIVO	NS	P[6]
25	76P6A	ITU	NEGATIVO	POSITIVO	NS	P[6]
38	116P6A	PIEIDADE	NEGATIVO	POSITIVO	NS	P[6]
40	S161P6A	BRAGANÇA	POSITIVO	POSITIVO	NS	P[6]
42	S18P6A	CAPIVARI	POSITIVO	POSITIVO	NS	P[6]
6	28P7A	CAMPINAS	POSITIVO	POSITIVO	NS	P[7]
41	S108P7A / S108G5A	IBIÚNA	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	P[7]
24	75G5A	ITU	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	NS
30	4BG5A	ITU	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	NS
43	S35G5A	MOGI DAS CRUZES	POSITIVO	POSITIVO	G[5]	NS
2	24G10A	CAMPINAS	POSITIVO	POSITIVO	G[10]	NS

Quadro 2 – Classificação das amostras fecais diarréicas de leitões oriundas de diversos municípios do Estado de São Paulo, segundo as provas de PAGE, ELISA, e PCR (genotipos G e P) - São Paulo – 2003

Nota: NS significa amostra não seqüenciada. GA significa os resultados oriundos da genotipagem / seqüenciamento G "animal"; PA significa os resultados oriundos da genotipagem / seqüenciamento P "animal".

* Número de ordem de acordo com o quadro 1.

5.5.1 Seqüenciamento dos genotipos P e genealogia

Nas figuras 12 e 13 estão apresentados, respectivamente, o alinhamento da seqüência de nucleotídeos entre as amostras 55P1A e Bo/A5/P1, e a de aminoácidos alinhada entre estas, relativos a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus.

Figura 12 – Alinhamento de nucleotídeos entre as amostras 55P1A e Bo/A5/P1, relativos a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

Figura 13 – Alinhamento de aminoácidos entre as amostras 55P1A e Bo/A5/P1, relativos a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

Nas figuras 14 e 15 estão apresentados, respectivamente, o alinhamento da sequência de nucleotídeos entre as amostras S161P6A, 76P6A, 116P6A, S18P6A, 49P6A, 28P6A, PO/GOTT/P6, e HU/ST3/P6, e a de aminoácidos alinhada entre estas, relativos a uma parte do segmento codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus.

Figura 14 – Alinhamento de nucleotídeos entre as amostras S161P6A, 76P6A, 116P6A, S18P6A, 49P6A, 28P6A, PO/GOTT/P6, e HU/ST3/P6, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

Figura 15 – Alinhamento de aminoácidos entre as amostras S161P6A, 76P6A, 116P6A, S18P6A, 49P6A, 28P6A, PO/GOTT/P6, e HU/ST3/P6, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

Nas figuras 16 e 17 estão apresentados, respectivamente, o alinhamento da sequência de nucleotídeos entre as amostras PO/TRF41/P7, PO/YM/P7, S108P7A, 28P7A, e a de aminoácidos alinhada entre estas, relativos a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus.

Figura 16 – Alinhamento de nucleotídeos entre as amostras PO/TRF41/P7, PO/YM/P7, S108P7A, e 28P7A, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

Figura 17 – Alinhamento de aminoácidos entre as amostras PO/TRF41/P7, PO/YM/P7, S108P7A, e 28P7A, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

Considerando-se apenas os fragmentos e amostras estudadas, observamos nos genótipos P alterações de aminoácidos não-sinônimas: entre as amostras P[1], num total de 15 aminoácidos (11,36%) (Figura 13); entre as amostras P[6] observa-se um mínimo de 0 aminoácidos e máximo de 11 (0% e 22%) (Figura 15); entre as amostras P[7] um mínimo de 1 aminoácido e máximo de 3 aminoácidos (1,21% e 3,65%) (Figura 17).

Nas figuras 18 e 19 estão apresentados, respectivamente, o alinhamento das seqüências de nucleotídeos entre todas as amostras pertencentes aos diversos genótipos P utilizados neste estudo, e a de aminoácidos, relativos a uma parte do segmento codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus.

Figura 18 – Alinhamento de nucleotídeos entre amostras pertencentes a diferentes genótipos P, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

	10	20	30	40	50
BO/A5/P1	TGYYST	TNYDSVNMTAYCDFYII	PLAQEAKCTEYINN	GLPPIQ	NTNRNVVP
55P1A		F.T			I
HU/ST3/P6	DSS	ALNNISI	IHSE	RS	S
PO/GOTT/P6	DST	SLPD	EVVIHTE	RS	S
28P6A	D	S	S	LSDAETVIHTE	RS
49P6A	D	S	S	LSE	ETVIHTE
76P6A	D	S	S	LSEIETVIHTE	RS
116P6A	D	S	S	LSEIETVIHTE	RS
S161P6A	D	S	S	LSEIETVIHTE	RS
S18P6A	D	S	S	LSEIETVIHTE	RS
PO/YM/P7					
PO/TRF41/P7					
28P7A					
S108P7A					
BO/B223/P11	VNI	ID	SG	TYRFVDYIKTSSTQ	YGS

Figura 19 – Alinhamento de aminoácidos entre amostras pertencentes a diferentes genótipos P, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

Na tabela 4 está apresentada a matriz de identidade de nucleotídeos entre todas as amostras pertencentes aos diversos genótipos P utilizados neste estudo, e relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus.

Tabela 4 – Matriz de identidade de nucleotídeos entre diversas amostras pertencentes a diferentes genótipos P, relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

Seq	A5/P1	55P1A	ST3P6	GOTP6	28P6A	49P6A	76P6A	116P6	S161	S18P6	YMP7	TRFP7	28P7A	S108P	B223
A5/P1	1,000	0,820	0,606	0,633	0,620	0,626	0,606	0,606	0,620	0,606	0,766	0,740	0,746	0,760	0,532
55P1A	---	1,000	0,666	0,680	0,666	0,666	0,693	0,693	0,680	0,693	0,786	0,766	0,773	0,793	0,539
ST3P6	---	---	1,000	0,753	0,753	0,760	0,746	0,740	0,753	0,746	0,626	0,626	0,646	0,620	0,513
GOTP6	---	---	---	1,000	0,853	0,853	0,840	0,833	0,840	0,840	0,646	0,646	0,666	0,660	0,519
28P6A	---	---	---	---	1,000	0,973	0,940	0,933	0,940	0,940	0,620	0,653	0,626	0,626	0,532
49P6A	---	---	---	---	---	1,000	0,946	0,940	0,940	0,946	0,646	0,680	0,653	0,653	0,546
76P6A	---	---	---	---	---	---	1,000	0,993	0,980	1,000	0,626	0,660	0,633	0,633	0,519
116P6	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,973	0,993	0,626	0,660	0,633	0,633	0,519
S161	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,980	0,620	0,653	0,626	0,626	0,519
S18P6	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,626	0,660	0,633	0,633	0,519
YMP7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,906	0,926	0,933	0,532
TRFP7	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,933	0,920	0,532
28P7A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,920	0,546
S108P	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,539
B223	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000

Nota: Sequências geradas neste trabalho estão em negrito.

A partir dos valores presentes na tabela 4, tem-se identidade média de nucleotídeos do genotipo P[1] de 82%; entre o genotipo P[6], de 88% (valor máximo 100% e mínimo de 74%); e entre o genotipo P[7] de 92,3% (valor máximo de 93,3% e mínimo de 90,6%).

Na figura 20 está apresentada a árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia realizada com o algoritmo exato "branch-and-bound" para todas as amostras pertencentes aos diversos genotipos P utilizados neste estudo, relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus.

Figura 20 – Árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia realizada com o algoritmo exato "branch-and-bound" para diversas amostras pertencentes aos diversos genótipos P, relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus, em escala de distância - São Paulo - 2003

Na figura 21 está apresentada uma outra disposição da árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia realizada com o algoritmo exato "branch-and-bound" para todas as amostras pertencentes aos diversos genótipos P utilizados neste estudo, e relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus, na qual se observa também os valores de "bootstrap" de cada ramo.

Figura 21 – Árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia, com valores de "bootstrap" para cada ramo, realizada com o algoritmo exato "branch-and-bound", considerando diversas amostras pertencentes aos diversos genótipos P, e relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP4 do rotavírus - São Paulo - 2003

5.5.2 Seqüenciamento dos genotipos G e genealogia

Nas figuras 22 e 23 estão apresentados, respectivamente, o alinhamento da seqüência de nucleotídeos entre as amostras S35G5A, S108G5A, 4BG5A, PO/A34G5, PO/A46/G5, PO/C134/G5, PO/OSU/G5, 75G5A, e a de aminoácidos alinhada entre estas, relativos a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus.

Figura 22 – Alinhamento de nucleotídeos entre as amostras S35G5A, S108G5A, 4BG5A, PO/A34G5, PO/A46/G5, PO/C134/G5, PO/OSU/G5, e 75G5A relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003 (Continua)

Figura 22 – Alinhamento de nucleotídeos entre as amostras S35G5A, S108G5A, 4BG5A, PO/A34G5, PO/A46/G5, PO/C134/G5, PO/OSU/G5, e 75G5A relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003 (Conclusão)

Figura 23 – Alinhamento de aminoácidos entre as amostras S35G5A, S108G5A, 4BG5A, PO/A34G5, PO/A46/G5, PO/C134/G5, PO/OSU/G5, e 75G5A relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003

Nas figuras 24 e 25 estão apresentados, respectivamente, o alinhamento da sequência de nucleotídeos entre as amostras 24G10A, PO/P343/G10, BO/A44/G10, BO/B11/G10, BO/B223/G10, e a de aminoácidos alinhada entre estas, relativos a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus.

		10		20		30		40		50
24G10A		G	T	T	A	T	T	A	T	T
PO/P343/G10	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/A44/G10	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B11/G10	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B223/G10	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		60		70		80		90		100
24G10A		C	A	T	T	A	T	T	G	T
PO/P343/G10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/A44/G10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B11/G10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B223/G10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		110		120		130		140		150
24G10A		A	T	G	C	A	A	A	T	T
PO/P343/G10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/A44/G10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B11/G10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B223/G10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		160		170		180		190		200
24G10A		C	C	A	T	T	G	C	A	A
PO/P343/G10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/A44/G10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B11/G10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B223/G10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		210		220		230		240		250
24G10A		C	T	T	G	T	A	T	T	A
PO/P343/G10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/A44/G10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B11/G10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
BO/B223/G10	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.
		260		270		280		290		300
24G10A		A	A	G	A	T	A	C	A	C
PO/P343/G10	C	G	A	G	.	.	.	.	.	.
BO/A44/G10	C	G	A	G	.	.	.	.	.	.
BO/B11/G10	C	A	G	.	.	.	.	.	.	.
BO/B223/G10	C	A	G	.	.	.	.	.	.	.

Figura 24 – Alinhamento de nucleotídeos entre as amostras 24G10A, PO/P343/G10, BO/A44/G10, BO/B11/G10, e BO/B223/G10, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo – 2003
(Continua)

Figura 24 – Alinhamento de nucleotídeos entre as amostras 24G10A, PO/P343/G10, BO/A44/G10, BO/B11/G10, e BO/B223/G10, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003 (Conclusão)

Figura 25 – Alinhamento de aminoácidos entre as amostras 24G10A, PO/P343/G10, BO/A44/G10, BO/B11/G10, e BO/B223/G10, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003

Considerando-se apenas os fragmentos e amostras estudadas, observamos alterações de aminoácidos não-sinônimas nos genótipos G: entre as amostras G[5] de até 6 aminoácidos (0% e 5,3%) (Figura 23) e entre as amostras G[10] um mínimo de 4 aminoácidos e máximo de 41 (2,27% e 23,29%) (Figura 25).

Nas figuras 26 e 27 estão apresentados, respectivamente, o alinhamento das seqüências de nucleotídeos entre todas as amostras pertencentes aos diversos genótipos G utilizados neste estudo, e as de aminoácidos alinhadas, relativos a uma parte do segmento codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus.

Figura 26 – Alinhamento de nucleotídeos entre amostras pertencentes a diferentes genótipos G, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003 (Continua)

Figura 26 – Alinhamento de nucleotídeos entre amostras pertencentes a diferentes genótipos G, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003 (Continuação)

Figura 27 – Alinhamento de aminoácidos entre amostras pertencentes a diferentes genótipos G, relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003

Na tabela 5 está apresentada a matriz de identidade de nucleotídeos entre todas as amostras pertencentes aos diversos genótipos G utilizados neste estudo, e relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus.

Tabela 5 – Matriz de identidade de nucleotídeos entre diversas amostras pertencentes a diferentes genótipos G, relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003

Seq	GOTG4	A34G5	A46G5	C134	OSUG5	75G5	S35G5	4BG5	S108	ICBG9	P343	A44	B11	B223	24G10	YMG11
GOTG4	1,000	0,750	0,743	0,762	0,756	0,753	0,750	0,750	0,746	0,833	0,727	0,727	0,740	0,724	0,753	0,759
A34G5	---	1,000	0,932	0,887	0,955	0,939	0,910	0,910	0,939	0,717	0,737	0,740	0,743	0,717	0,766	0,807
A46G5	---	---	1,000	0,875	0,945	0,942	0,907	0,907	0,942	0,708	0,743	0,750	0,759	0,746	0,759	0,817
C134	---	---	---	1,000	0,894	0,891	0,871	0,871	0,884	0,733	0,730	0,733	0,733	0,721	0,775	0,826
OSUG5	---	---	---	---	1,000	0,958	0,935	0,935	0,958	0,711	0,730	0,733	0,750	0,724	0,769	0,817
75G5	---	---	---	---	---	1,000	0,932	0,932	0,993	0,701	0,740	0,743	0,753	0,733	0,756	0,823
S35G5	---	---	---	---	---	---	1,000	1,000	0,932	0,721	0,727	0,737	0,740	0,727	0,756	0,820
4BG5	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,932	0,721	0,727	0,737	0,740	0,727	0,756	0,820
S108	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,701	0,743	0,746	0,756	0,737	0,756	0,820
ICBG9	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,711	0,708	0,724	0,733	0,740	0,743
P343	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,971	0,919	0,919	0,730	0,746
A44	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,919	0,923	0,743	0,750
B11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,945	0,750	0,746
B223	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,737	0,743
24G10	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000	0,766
YMG11	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1,000

Nota: Sequências geradas neste trabalho estão em negrito.

A partir dos valores presentes na tabela 5, tem-se a identidade média para os genótipos G[5] de 92,52% (valor máximo de 100% e mínimo de 87,1%); e entre o genótipo G[10], de 85,56% (valor máximo de 97,1% e valor mínimo de 73%).

Na figura 28 está apresentada a árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia realizada com o algoritmo exato "branch-and-bound" para todas as amostras pertencentes aos diversos genótipos G utilizados neste estudo, e relativo a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus.

Figura 28 – Árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia realizada com o algoritmo exato "branch-and-bound" para diversas amostras pertencentes aos diversos genótipos G, e relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus, em escala de distância - São Paulo - 2003

Na figura 29 está apresentada uma outra disposição da árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia realizada com o algoritmo exato "branch-and-bound" para todas as amostras pertencentes aos diversos genótipos P utilizados neste estudo, e relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus, na qual se observa também os valores de "bootstrap" de cada ramo.

Figura 29 – Árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia, com valores de "bootstrap" para cada ramo, realizada com o algoritmo exato "branch-and-bound", considerando diversas amostras pertencentes aos diversos genótipos G, e relativa a uma parte do gene codificador da proteína estrutural VP7 do rotavírus - São Paulo - 2003

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As diarreias constituem-se hoje a principal causa de mortalidade infantil em diversos países do mundo, principalmente naqueles “em desenvolvimento”. Bern e Glass (1994) e Guerrant et al. (1983) nos mostram alguns dados acerca da gravidade das gastroenterites: dos índices totais observados em seres humanos, 60% da morbidade total e 90% da mortalidade total inerentes às diarreias correspondem a crianças de menos de 5 anos de idade, nas quais diarreias são responsáveis por 25 a 35% do total de óbitos, resultando em 3,3 milhões de crianças morrendo em função de diarreias a cada ano, considerando-se os países subdesenvolvidos, exceto a China. Destes países, tem-se uma estimativa de 2,2 episódios de diarreia por criança por ano, com um total de 1,1 a 1,7 bilhões de episódios diarreicos por ano em uma população de 500 milhões de crianças abaixo de 5 anos, com preponderantemente na faixa etária de 6 a 11 meses. Em veterinária, tem-se visto crescer a importância desta síndrome, e suas implicações, tanto em seus aspectos econômicos, como os de saúde animal e de saúde pública.

Passados 34 anos do primeiro relato dos rotavírus, e após o diagnóstico, seguido das caracterizações morfológica, protéica, antigênica e genética, determinação dos mecanismos de infecção e imunidade, podemos dizer que os estudos acerca dos rotavírus têm recentemente se concentrado em:

(i) levantamentos de ocorrência genotipos e/ou sorotipos em variadas coleções de amostras humanas e animais em diferentes países;

- (ii) na variação e padrões de ocorrência de diferentes tipos de rotavírus em estudos retrospectivos;
- (iii) no diagnóstico e entendimento dos padrões de infecções mistas, rearranjos genéticos e mutações pontuais, bem como suas implicações na classificação viral;
- (iv) na sua transmissão interespecies;
- (v) na evolução filogenética;
- (vi) mecanismos imunológicos de defesa contra as infecções, incluindo aqui a necessidade de proteção homotípica *versus* a heterotípica e desenvolvimento de novas vacinas (especialmente humanas) com padrões elevados e homogêneos de efetividade, seguras e de baixo custo.
- (vii) o papel das enterotoxinas virais na patogenia das diarreias;
- (viii) na busca de explicações na cadeia epidemiológica sobre a ocorrência de genotipos comuns a uma espécie animal numa outra, sem evidente contato direto entre as mesmas.

Dentro desse contexto, a PCR para a determinação dos genotipos G e P de rotavírus tornou-se uma técnica amplamente empregada em diversos trabalhos, possibilitando contornar limitações impostas pelos métodos sorológicos e contribuir na elucidação de diferentes aspectos anteriormente citados. Apesar disto, são raras as descrições, principalmente no Brasil, que fornecem dados epidemiológicos acerca dos rotavírus suínos.

Os municípios envolvidos neste estudo representam áreas de intensa produção suína no Estado de São Paulo, de acordo com o último censo agropecuário (IBGE, 1996), e, de um total de 144 amostras fecais de leitões colhidas entre diferentes criações, 43 delas foram triadas por PAGE e/ou ELISA (item 5.1 e 5.2), das quais definiram-se em 41 amostras (28,47%) pelo menos um genotipo P ou G (Quadro 1). Este fato demonstra a elevada ocorrência dos rotavírus, considerando que todos os 10 municípios envolvidos no estudo tiveram pelo menos 1 amostra positiva para este vírus.

Inicialmente podemos atribuir explicações sobre tal positividade às condições ambientais e de manejo às quais estes animais são submetidos. O regime de criação intensivo leva-os a permanecerem agrupados, o que aumenta a densidade populacional e facilita a transmissão da doença; além disso, mesmo havendo separação dos animais por faixas etárias e lotes, estão presentes outros fatores de risco para o desencadeamento das rotaviroses, entre eles: a falha na ingestão suficiente de colostro, o stress do desmame e de adaptação à creche, o elevado número de partículas de rotavírus excretadas, a sua resistência ambiental, a falta ou a inadequada de higienização das instalações, mãos, botas e vestimentas dos tratadores (DAGENAIS et al., 1980; PARASHAR et al., 1998; RADOSTITIS; ACRES, 1983; RAMOS et al., 2000).

As duas amostras (Quadro 1, ordem 18 e 20) nas quais não foi possível a sua genotipagem pertenciam a uma mesma propriedade, embora positivas pela prova ELISA, uma delas era também positiva por PAGE. O mais provável é que os rotavírus evidenciados pelos testes de triagem tenham fugido à sua caracterização pelo fato de seus genotipos não estarem contemplados no conjunto de primers empregados, ou seja,

seriam genótipos (ou mesmo grupos) atípicos encontrados em suínos. Pode-se, entretanto, atribuir-se também a uma perda de material nas etapas de extração de RNA e/ou transcrição reversa, hipótese em parte refutada pela repetição do processamento destas em outros momentos. Rasool et al. (2002) relatam que sucessivas alterações de temperatura devido ao congelamento-descongelamento podem levar a degradação da partícula viral contribuindo dessa maneira para uma maior ação destes inibidores inespecíficos. Deve-se levar em conta também a possibilidade de variações nos sítios de ligação dos primers (WINIARCZYK et al., 2002) e a possibilidade de reações tipo "falso-positivo" no ELISA, onde a amostra 20 poderia ser de fato negativa, havendo concordância portanto entre as provas de PCR e PAGE.

Com relação à concordância entre ELISA e PAGE (Tabela 1), inicialmente devemos considerar que o teste Kappa expressa a proporção de concordância entre dois testes; um valor kappa igual a 0 indica nenhuma concordância, entre 0,4 e 0,5 indica moderada concordância e kappa = 1 indica concordância perfeita (MARTIN et al., 1987). Obteve-se o valor de Kappa de 0,54, o que significa uma moderada concordância.

O teste J de Youden combina informações sobre sensibilidade e especificidade em um único resultado, podendo assumir valores entre 1 e -1. Conforme aumentam a sensibilidade e a especificidade, aumenta também o valor de J. O valor de J é igual a 1 quando a soma da especificidade e da sensibilidade é igual a 200%, 0 quando a soma é 100% e -1 quando a soma é zero (MARTIN et al., 1987). Assim, como o valor de J para comparações entre PAGE e ELISA foi igual a 0,675 (item 5.3), este teste corrobora a baixa concordância entre estas duas provas.

A adoção dos testes em paralelo possibilitou uma triagem eficiente, contornando as limitações impostas pelos baixos valores de sensibilidade relativa entre as provas e valor preditivo positivo. Com a evolução dos métodos de diagnóstico estes tendem a baixar o limiar de detecção, trazendo implicações na sensibilidade do teste. Em outras palavras, a adoção da prova de PAGE como padrão para a prova de ELISA, em função do menor limiar de detecção desta última prova, pode proporcionar a ocorrência de reações tipo “falso-positivo” sem que, no entanto, o sejam realmente (HUSAIN; SETH; BROOR, 1995; MARKOWSKA et al., 1996). Cabe a quem realiza ou desenvolve o teste definir o caráter sensível ou específico que se deseja obter, pois foi realizada apenas uma triagem do material. Não foram calculadas as concordâncias PAGE/PCR, nem ELISA/PCR uma vez que mesmo não se obtendo tipificação da amostra por PCR, não implica necessariamente que ela seja negativa para a presença de rotavírus.

Aliás, a não genotipagem de amostras é um fato comum nos estudos de caracterização genotípica. Winiarczyk et al. (2002), não obtiveram genotipagem em 3,2% das amostras suínas dos Estados Unidos para G; 12,9% para P. Analogamente, utilizando amostras oriundas da Polônia, não obteve genotipagem em 45,5% para G e 61,4% para P. Alfieri (1999) por sua vez, obteve definição de genotipos em 96% das amostras submetidas a PCR. Iturriza-Gomara et al. (1999) relataram que ao compararem a genotipagem G contra a sorotipagem G, 92% das amostras foram tipificadas pelo primeiro método e apenas 64% sorotipadas utilizando anticorpos monoclonais específicos. Fukai et al. (2002) identificaram o genotipo G em 76% e P em 68,3% das amostras bovinas submetidas a PCR. Para a caracterização de amostras não genotipadas sugere-se o emprego conjunto de reações sorológicas, entre elas o ELISA com anticorpos monoclonais para genotipos G e/ou P, e de reações de PCR que utilizem

primers dirigidos àqueles genótipos não contemplados, ou mesmo para grupos não-A (GOUVEA et al., 1991; KIM et al., 1999; SEN et al., 2000).

De acordo com a figura 8, o genótipo G[5] (30,23% do total de amostras genotipadas) foi o de maior ocorrência em infecções singulares, seguido pelo G[10] (20,93%), e G[6] (4,65%). Em infecções simultâneas, observou-se somente a associação G[5]+G[10] (18,6%). Além disso, obteve-se a não tipificação em 11 amostras (25,58%).

Pela análise da figura 9, o genótipo G[4] (27,9%) foi o de maior ocorrência em infecções singulares, seguido pelos genótipos G[3] (13,95%). As associações G[3]+G[4], G[2]+G[3]+G[4], e G[2]+G[3] ocorreram, respectivamente em 9,3%, 4,65% e 2,32%, sem que, no entanto, tivesse sido observada a ocorrência singular do genótipo G[2]. Não foi obtida a tipificação G "humana" em 18 amostras (41,86%).

O genótipo G[5] é o mais descrito em suínos, representado pela amostra protótipo suína OSU. Além deste, já foram descritos os genótipos G[4](Gottfried), G[3] (CRW-8) e G[11] (YM) , e os genótipos bovinos G[6](NCDV), G[8](Cody) e G[10](KK3) (MARTELLA et al., 2001), embora genótipos humanos tais como G[1], G[2], e G[9] já tenham sido identificados.

Assim sendo, a predominância do genótipo G[5] neste trabalho está em concordância com diversos relatos descritos tanto no Brasil como em outras regiões. Nesse sentido, Rácz et al. (2000) caracterizaram molecularmente amostras fecais de suínos criados na região sul do Brasil, detectando genótipos comuns a estas criações, como o G[5], G[3], G[4], bem como G[10] e um atípico, o G[9], e combinações entre G[4] e G[9] e entre G[5] e G[10].

Alfieri (1999) ao testar amostras fecais diarréicas em leitões da região Norte, Oeste e Sudoeste do Estado do Paraná, observaram a ocorrência de infecções singulares G[5], G[4] e G[3]; infecções mistas G[3]G[5]; G[3]G[4] e G[5]G[10], estes 2 últimos tanto isoladamente como em conjunto.

Santos et al. (1999) utilizando amostras fecais de suínos da região Sudoeste do Paraná entre março de 1991 e março de 1992, detectaram os genótipos G[1], G[4], G[5] e G[9].

Em outros países os relatos são semelhantes. Solarte et al. (1999) detectaram G[5] em suínos na Colômbia. Winiarczyk et al. (2002) detectaram a ocorrência dos genótipos G[3], G[4], G[5], G[9] e G[10] em amostras fecais de suínos nos Estados Unidos e G[3], G[4], G[5] naquelas oriundas da Polônia.

Cabe salientar 2 aspectos. Um deles é que o genótipo G[2], encontrado em associação com os genótipos G[3] e G[4] neste trabalho, é pouco freqüente nos rebanhos suínos, tendo como referência o relato de Bellinzoni et al. (1990) ao detectarem os sorótipos G[1] e G[2] em Buenos Aires, Argentina. Outro fato é a detecção do genótipo G[10] que é típico e com elevada ocorrência em bovinos no Brasil (BRITO, 1998) e no mundo (CIARLET et al., 1997; FALCONE et al., 1999; FUKAI; SAKAI; HAMATA, 1998). Além dos relatos anteriores de Rácz et al. (2000) e Alfieri (1999) deste genótipo, corroboram estes achados, os de Pongsuwanna et al. (1996) ao detectarem também na Tailândia o genótipo bovino G[10] e o de Martella et al. (2001), que na Itália identificaram em suínos o genótipo G[6], também comum em bovinos. El-Attar et al. (2001) caracterizaram molecularmente uma amostra bovina PP-1, replicada experimentalmente em suínos sem causar diarreia, mas causando severa atrofia de vilo antes e após a passagem em cultivo celular.

No Brasil, Santos et al. (1998) detectaram em crianças no Estado do Rio de Janeiro a ocorrência de genótipos humanos convencionais G[1] e G[3], enquanto que 60% das infecções eram causadas por genótipos incomuns, entre eles o G[5], G[10] e G[8].

Em 1996, Leite et al. ao caracterizarem amostras fecais de crianças em 9 Estados do Brasil e do Distrito Federal, referentes ao período de 1982 a 1994, observaram a ocorrência dos genótipos G[1], G[2], G[3] e G[4] como os mais prevalentes (nesta ordem), mas ressaltavam que amostras atípicas, entre elas a G[5] estavam presentes nas caracterizações. Gouvea et al.(1994) também detectaram a amostra G[5] em 17% das amostras oriundas de crianças no Brasil, e estudos posteriores envolvendo hibridização RNA-RNA sugeriram que o genótipo G[5]P[8] era um possível “reassortant” humano-suíno.

Coluchi et al. (2002) detectaram em amostras fecais de crianças com diarreia aguda no Paraguai, entre janeiro de 1999 a março de 2000, infecções mistas de genótipos de rotavírus humanos e animais, nas seguintes combinações: G[4]G[5], G[4]G[5]G[10] e G[1]G[10].

Estes achados endereçam a importância do monitoramento de rebanhos bovino e suíno, bem como nas populações humanas, de modo a se detectarem situações de possível infecção cruzada.

Analogamente, no tocante à genotipagem P "animal", de acordo com a figura 10, o genótipo P[6] (25,58%) foi o de maior ocorrência em infecções singulares, seguido pelos genótipos P[1] (11,62%) e P[7] (9,3%). Observaram-se as associações

P[6]+P[7], P[1]+P[6], E P[1]+P[6]+P[7] em 9,3%, 4,65% e 2,32% das amostras, respectivamente. Não foi obtida a tipificação P "animal" em 37,20% das amostras.

Em relação à genotipagem P "humana", de acordo com a figura 11, observou-se apenas o genotipo P[6] (65,11%) foi o único genotipo detectado. Em 15 amostras (34,88%) não foi obtida a genotipagem.

Inicialmente vale destacar que o gene 4 da amostra de rotavírus suíno Gottfried compartilha um elevado grau de similaridade com o gene 4 das amostras humanas M37, 1076 e ST3, e, portanto, tais amostras foram classificadas mediante um mesmo genotipo P. Contudo o primer desenhado por Gouvea, Santos e Timenetsky (1994b) é capaz de distinguir a amostra animal daquelas humanas, daí a designação P[6,Gott-like] e P[6,M37-like] respectivamente. Na ocasião os autores também salientavam a necessidade de uma revisão no sistema de tipificação P, no qual a amostra Gottfried representaria um tipo separado.

Os genotipos P mais freqüentes em suínos são o P[6] e P[7], os quais correspondem aos tipos Gottfried e OSU. Entretanto, outros genotipos P já foram descritos em suínos, entre eles o P[14] e P[19]. Com relação aos genotipos humanos, tem-se o relato do encontro de genotipos P[8] (GOUVEA et al., 1999), P[6,M37-like], e genotipos bovinos, como o P[1], P[5] e P[11], também em amostras fecais suínas (MARTELLA, 2001).

Com relação aos genotipos P encontrados podemos dizer que eles também estão em concordância com aqueles descritos na literatura por outros autores. Ressalte-se, contudo, a grande participação de genotipo bovino P[1] nos achados deste trabalho, o que supõe, aliada a constatação dos genotipos G, indicações para

uma transmissão bovino-suína e o encontro de genotipo P[6,M37-like] tipicamente humano.

Alfieri (1999) ao testar amostras fecais diarréicas em leitões da região Norte, Oeste e Sudoeste do Estado do Paraná, observaram a ocorrência de infecções genotipos P[6] e P[7].

Martella et al. (2001) detectaram na Itália em suínos o genotipo P[5], tipicamente bovino. Winiarczyk et al. (2002), por sua vez, relatam o encontro dos genotipos P[6] e P[7] tanto em amostras suínas dos Estados Unidos como da Polônia.

Rácz et al. (2000) detectaram os genotipos P[6,Gott] e P[6,M37] e P[7], tanto isoladamente como em associação. Na ocasião, os autores sugerem a possibilidade de troca entre os genes VP4 entre rotavirus humanos e animais.

Leite et al. (1996) detectaram a predominância dos genotipos P[8] e P[4] em crianças no Brasil, porém sendo também detectadas os genotipos incomuns como o P[6] e P[9]. Coluchi et al. (2002), detectaram em amostras fecais de crianças com diarréia aguda no Paraguai, entre janeiro de 1999 a março de 2000, os genotipos P[8], P[4] e P[1].

A análise das tabelas 2 e 3, nos permitem observar que houve a predominância da ocorrência dos tipos G[5]P[6] e G[4]P[6], porém foram detectadas muitas combinações e genotipos atípicos em suínos e "reassortants" considerando como protótipos as amostras OSU (G[5]P[7]) e Gottfried (G4P[6]).

Gouvea e Brantly (1995) sugerem que a observação de múltiplas e complexas misturas de tipos G e P no campo possa ser devida a altas taxas de rearranjo que ocorrem durante infecções naturais. Aliás, a capacidade dos rotavírus em realizarem “reassortants” foi uma das estratégias para o desenvolvimento de vacinas (“reassortants” rhesus-humana e bovina-humana) com resultados variáveis (PARASHAR et al., 1998). Saliente-se o fato de que, diferentemente das DNA polimerases, as RNA replicases (RNA-dependente RNA polimerases) não possuem atividade de “proof reading”, o que leva a possibilidade de altas frequências de mutação durante a replicação viral. Como consequência qualquer RNA vírus é um consenso de uma população heterogênea de variantes relacionadas que emergem por mecanismos de seleção.

Portanto, assumindo-se que o inoculo natural de rotavírus é um “pool de reassortants” e variantes relacionadas que é transmitida aos indivíduos ou animais, da mesma ou de diferentes espécies e que a composição do vírus é ditada por fatores intrínsecos presentes em cada hospedeiro infectado, é possível prever as seguintes características epidemiológicas (GOUVEA; BRANTLY, 1995):

- (i) a existência de uma grande diversidade de amostras de rotavírus;
- (ii) a coexistência de várias amostras circulantes numa comunidade ou região a um dado momento;
- (iii) o aparecimento de novas (convencionais e ocasionalmente atípicas) amostras e desaparecimento de antigas numa comunidade ou região;
- (iv) desvios na prevalência de amostras numa comunidade ou região ao longo do tempo;

(v) a persistência de amostras com características específicas em determinadas populações ou espécies;

(vi) a presença ocasional de múltiplas amostras em quantidades detectáveis numa única amostra fecal.

Este padrão é comum na epidemiologia das rotaviroses observadas por diversos autores, e parte delas contempladas nos resultados deste trabalho.

Um marco teórico que pode congrega estes fatos é o conceito de quasiespécie viral (DOMINGO, 2002; DOMINGO et al., 1998), que são conjuntos de amostras constituídas por genomas virais muito relacionados (mas não idênticos) mutantes e recombinantes sujeitos a contínuas variações genéticas, competição e seleção.

Embora as altas frequências de mutação permitam aos RNA vírus a variabilidade necessária para se adaptarem a novos hospedeiros e ambientes, quando transmitidos a grandes populações elas são prejudiciais sempre que a população viral é reduzida a um ou poucos vírions. Neste caso, a acumulação de mutações deletérias levaria a falta de “fitness” (adequação) da população de vírus e a eventual extinção. Os mecanismos de rearranjo genético possibilitariam trocas de informações entre variantes resultando numa rápida e potencialmente drástica mudança na habilidade da população viral suplantando o sistema imune do hospedeiro ou infectar novos hospedeiros, principalmente se há uma elevada e constante produção de novas partículas (GOUVEA; BRANTLY, 1995), o que pode eventualmente explicar variações observadas em estudos de eficácia vacinal, transmissão interespecies e estudos de genotipagem, como o presente. Cabe aqui

ressaltar que os rotavírus são excretados em volumes de aproximadamente 10^8 a 10^{12} partículas/mL (XU; HARBOUR; MCCRAE, 1990).

O balanço entre taxas de mutação e ciclos de replicação seria uma das razões para a grande adaptabilidade dos RNA vírus (DOMINGO et al., 1998). De uma maneira geral, infecções mistas têm sido consideradas como o resultado de duas infecções independentes ocorrendo simultaneamente ou seqüencialmente no mesmo hospedeiro. Se dois vírus infectam a mesma célula, a recombinação pode ocorrer. Embora várias amostras circulem juntas numa população, as chances para infecção dual e aparecimento de novos vírus são baixas (KAPIKIAN; CHANNOCK, 1996). Entretanto, neste caso, espera-se que na mesma amostra de fezes estejam presentes partículas oriundas de “reassortants” e as ancestrais. Estes pools heterogêneos, ou quasiespécies, irão perpetuar na população, principalmente se houver uma diversidade de tipos (GOUVEA; BRANTLY, 1995).

Tem-se argüido que, se as distribuições de quasiespécies estão envolvidas na persistência viral, todos os RNA vírus seriam capazes de estabelecer infecções persistentes, mas contrariamente apenas uma minoria o faz. Deve-se levar em conta, portanto, que este fenômeno é uma interação entre os vírus e seus hospedeiros, e a estrutura de quasiespécies não implica necessariamente numa persistência viral (DOMINGO et al., 1998).

Das 25 amostras submetidas à reação de seqüenciamento, foram obtidas 14 seqüências viáveis para análise genealógica (Quadro 2). Podemos inicialmente atribuir estas perdas em diferentes etapas da técnica de seqüenciamento, entre elas a purificação do produto de PCR do gel (item 4.6.1.2), que além de uma redução na concentração de DNA “alvo”, pode levar à incorporação de substâncias que afetem a

reação, por exemplo a presença de traços de agarose. Outro ponto crítico é a quantificação de DNA purificado, sendo que no presente trabalho foi utilizando Low Mass DNA Ladder (item 4.6.1.3), possibilitando uma estimativa visual rápida e de baixo custo, conquanto possa incorrer em erros, o que levaria ao uso na reação de seqüenciamento, de um excesso ou falta de DNA "alvo". Por outro lado, adotamos a estratégia de purificação dos produtos de "nested-PCR" a partir do gel de agarose, que apresenta a vantagem de, na própria eletroforese, isolar-se somente o fragmento de tamanho desejado, reduzindo a presença de seqüências interferentes.

Uma outra causa pode estar ligada ao fato da reação de seqüenciamento apresentar uma etapa em que as amostras são submetidas a um protocolo universal (item 4.6.1.6) onde os primers empregados na reação encontram-se submetidos a diferentes condições de variação de temperatura, e portanto não otimizadas, daquelas anteriormente propostas por Gouvea, Santos e Timenetsky (1994a,b) (item 4.5.4.1), impedindo a adequada marcação com os terminadores.

Outras razões relacionam-se com características inerentes ao equipamento de seqüenciamento de DNA, tais como uma eletroinjeção insuficiente, depósitos de polímero no capilar, ou mesmo resíduos de terminadores não incorporados (APPLIED BIOSYSTEMS, 2001).

Devemos ainda considerar que, devido a possibilidade do encontro de estruturação em quasiespécies (DOMINGO et al., 2002) de rotavírus, os dados de seqüenciamento podem, teoricamente, trazer consigo posições ou áreas de indefinição dos seus nucleotídeos, o que impossibilita a interpretação das seqüências, sendo portanto descartadas.

Um outro fato observado é que foram obtidas algumas seqüências totalmente viáveis, porém curtas, o que limitaria a análise genealógica a uma quantidade muito pequena de nucleotídeos, e estas não foram incluídas na elaboração das genealogias.

Mediante a observação do quadro 2 observamos que 3 amostras (número de ordem 14, 25 e 38) apresentaram-se negativas à técnica de PAGE, porém positivas pela técnica de ELISA. O achado de PCR positivo, confirmado pela definição dos nucleotídeos destas mesmas amostras, corrobora a importância do uso conjunto e paralelo de ELISA e PAGE, evitando a geração de resultados tipo falso-negativo, na triagem de amostras fecais, o que aconteceria caso tivesse sido optada apenas a técnica de PAGE.

De acordo com as figuras 12, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, e 25, (itens 5.5.1 e 5.5.2) observamos que foi um achado comum a todas as amostras envolvidas no estudo, quer pertencentes ao genotipo P ou G, a ausência de "gaps" nos alinhamentos de nucleotídeos e aminoácidos. Além disso, foram semelhantes, em termos de composição de aminoácidos, as amostras seqüenciadas com aquelas previamente depositadas no GenBank, o que dá sustentabilidade ao alinhamento e confere plausibilidade às seqüências geradas. Rao, Gowda e Reddy (2000) ao alinharem a seqüência de nucleotídeos da amostra bovina Hg18 com amostras representativas de cada um dos 14 genotipos G, relatam a ocorrência de "gaps" somente ao incluírem a amostra Ch2 G[7] de origem aviária. Já com relação ao VP4, ao alinharem sequencias de 20 genotipos P, também com a amostra Hg18, os "gaps" foram mais frequentes, incluindo as amostras RV5, KU, KK3, EDIM, 4F, e 993/83.

Através da análise das tabelas 4 e 5, das figuras 18, 19, 26, 27 e dos cálculos de identidade, podemos afirmar que foram detectadas substituições de nucleotídeos e de aminoácidos em amostras pertencentes um mesmo genotipo, o que a denota a existência de polimorfismos nos rotavírus entre os municípios envolvidos no presente estudo. Temos, portanto, duas implicações: a primeira delas é a variabilidade entre os nucleotídeos das amostras que pode se estender para a área de hibridização dos primers na reação de genotipagem P ou G através da PCR, e como esta é baseada na complementaridade de alguns poucos nucleotídeos, podemos observar a geração de resultados tipo falso-negativo ou falso-positivo nesta reação. Propõe-se para o contorno desta limitação, revisões constantes das seqüências de nucleotídeos descritas em diferentes regiões e espécies animais, que reflitam numa análise crítica dos primers utilizados em genotipagem, sendo que os mais amplamente utilizados por diversos pesquisadores em todo o mundo, foram propostos há aproximadamente 10 anos por Das et al. (1994), Gentsch et al. (1992), Gouvea et al. (1990), Gouvea, Santos e Timenetsky (1994a,b), mediante um universo amostral de seqüências de rotavírus bem menos amplo se comparado com o atual.

Nesse sentido, Winiarczyk et al. (2002) propõe novos primers para a detecção de genotipos G[3], G[4], G[5], P[6] e P[7], e salienta a identificação de produtos de RT-PCR G[3] após a sua reamplificação com um primer específico para G[10].

A segunda implicação relaciona-se com a hipótese de alterações de antigenidade e imunogenicidade dos rotavírus, pois se as substituições de nucleotídeos são freqüentemente observadas em amostras de campo pertencentes a um mesmo genotipo, podem também haver alterações não-sinônimas que

resultem numa estrutura protéica divergente. Deve-se considerar também este fato no emprego e desenvolvimento de métodos diagnósticos e de medidas profiláticas específicas para esta doença. Com efeito, no presente estudo, observamos alterações de aminoácidos não-sinônimas nos genótipos P entre as amostras P[1], num total de 15 aminoácidos (11,36%) (Figura 13); entre as amostras P[6] observa-se um mínimo de 0 aminoácidos e máximo de 11 (0% e 22%) (Figura 15); entre as amostras P[7] um mínimo de 1 aminoácido e máximo de 3 aminoácidos (1,21% e 3,65%); por sua vez, nos genótipos G, entre as amostras G[5] de até 6 aminoácidos (0% e 5,3%) (Figura 23) e entre as amostras G[10] um mínimo de 4 aminoácidos e máximo de 41 (2,27% e 23,29%). Outros autores relatam a ocorrência de diferentes taxas de identidade entre aminoácidos, por exemplo, Rácz et al. (2000), comparando a amostra ICB2185 com diversas outras representativas de genótipos G, obtiveram identidade variando de 86,7% (amostra Gottfried, aminoácidos 87 a 101); 63,3% (para amostras Gottfried, ST3, e M3014, aminoácidos 142 a 152); 85,7% (para amostra M3014, aminoácidos 208 a 221), e 100 % (para amostra Gottfried, aminoácidos 238 a 242).

As genealogias P e G foram feitas a partir de uma região de alinhamento de nucleotídeos comum a todas amostras (Figuras 18 e 26). Observa-se a partir do alinhamento de aminoácidos elevada proporção de alterações não-sinônimas agora entre os diferentes genótipos P, por exemplo, amostras BO/A5/P1 e BO/B223/P11, com valor de 88% (Figura 19), e entre PO/GOTT/G4 e PO/A34/G5, com valor de 26,92% (Figura 27).

Com relação às árvores consenso não enraizadas de máxima parcimônia obtidas para as genealogias P e G, observamos que há concordância com a

genotipagem, isto é, as seqüências de nucleotídeos geradas neste estudo pertencentes ao mesmo genotipo P ou G tenderam a ficar próximas entre si (Figuras 20 e 28) tendo sua significância estatística sustentada por valores aceitáveis de “bootstrap” (Figuras 21 e 29) na medida em que genotipos diferentes encontram-se distantes. Aliás, a topologia obtida por este procedimento deve ser encarada como uma estimativa da relação genealógica entre um grupo de amostras ou seqüências (BROWN, 1994), não visando alterar as classificações existentes, mas apenas conhecer as relações que ocorrem entre os grupos (MIYAKI, 2001).

No tocante à topologia da árvore consenso não enraizada de máxima parcimônia P (Figuras 20 e 21), as amostras P[6] presentes nos diversos municípios de São Paulo, foram divergentes das amostras PO/GOT/P6 e HU/ST3/P6, porém, entre si formaram ramos politômicos, o que denota a variabilidade de nucleotídeos presente entre tais amostras sem que houvesse sítios de parcimônia suficientemente discriminativos para a definição de sua genealogia.

Observa-se também que as amostras 28P6A e 49P6A estão localizadas num ramo distinto das amostras 76P6A, 116P6A S18P6A, e S161P6A, o que demonstra a circulação de pelo menos 2 grupos de amostras P[6] oriundas de leitões provenientes de granjas localizadas no Estado de São Paulo. Analogamente, observa-se o agrupamento das amostras S108P7A e 28P7A em diferentes ramos da árvore (Figura 21) demonstrando também a circulação de 2 grupos nestas granjas.

Aventa-se a possibilidade de uma maior proximidade geográfica segundo a origem das amostras, o que levaria à circulação e disseminação de rotavírus mais relacionados genealogicamente entre si, em nosso meio. Cabe ressaltar que as amostras seqüenciadas no presente trabalho são oriundas diretamente de material

fecal, não tendo sido passadas em células, sendo que este último procedimento pode levar à seleção de determinadas sub-populações em detrimento de outras, por seleção positiva, criando-se um viés para a obtenção da sequência "real" ou preponderante, como relatado para outros vírus em cultivo celular (HAYS; MYINT, 1998).

Desselberger (1996) relata que num único indivíduo (ou animal) podem existir diversas formas de rearranjos de rotavírus (por exemplo afetando os segmentos 8, 10 e 11) e várias combinações podem coexistir e serem recuperadas através de purificação em placa. Segundo este mesmo autor, pelo menos 12 sub-populações de rotavírus foram identificadas em apenas um isolado, as quais modificaram sua prevalência relativa quando observados em diferentes momentos. Uma outra evidência da existência de populações geneticamente heterogêneas ocorre com a amostra protótipo suína SA-11 de rotavírus: apesar de todas as amostras serem originárias de um único isolado viral, observou-se uma variante com eletroferótipo e sorotipo P divergentes daquele original (GOUVEA; BRANTLY, 1995).

No tocante à topologia da árvore consenso não enraizada de máxima parcimônia G (Figuras 28 e 29), as amostras G[5] presentes nos diversos municípios de São Paulo, foram divergentes das amostras anteriormente descritas PO/A34/G5, PO/OSU/G5, e PO/A46/G5, mas, entre si, formaram 2 grupos constituídos pelas amostras 75GA/S108G5A e S35G5A/4BG5A o que denota a circulação de amostras G[5] distintas na população suína. A única amostra G[10] incluída apresenta-se distante daquelas G[10] importadas do GenBank.

As politomias observadas tanto nas árvores P ou G podem ter sido geradas pelo número de seqüências consideradas na análise, do emprego de um fragmento

não suficientemente longo, ou de uma área do gene que não traz sítios de parcimônia suficientes para a resolução da genealogia. Ficam como possibilidades para a resolução destas politomias, a inclusão de mais seqüências de nucleotídeos oriundas de amostras de campo, outras amostras de referência e o seqüenciamento de uma maior porção dos genes relacionados, para que se verifique se os achados se mantêm ou se são exclusivos de regiões aqui estudadas.

A partir do exposto, ficam como perspectivas futuras dentro do estudo das rotaviroses:

- (i) o estudo da virulência de diferentes amostras e a sua correlação com a seqüência de nucleotídeos;
- (ii) o desenvolvimento e eficácia de novas vacinas para rotavírus em medicina veterinária;
- (iii) entendimento dos mecanismos de ocorrência predominante de um (ou mais) tipos de rotavírus numa dada espécie animal;
- (iv) a influência de outros enteropatógenos no desencadeamento dos quadros diarréicos;
- (v) a quantificação das medidas de manejo na diminuição da ocorrência das diarréias virais;
- (vi) a ocorrência preponderante de determinadas combinações de genotipos G e P em determinadas situações e a capacidade dos rotavírus de adaptação dos rotavírus numa nova espécie animal.

Todos estes aspectos têm como convergência um delineamento de medidas profiláticas eficazes e seguras, que considere a cadeia epidemiológica das rotaviroses e contemple todos os aspectos envolvidos na ocorrência das gastroenterites.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Face ao exposto neste trabalho, concluímos que:

a) A partir de 144 amostras fecais diarréicas de suínos criados em granjas localizadas em diversos municípios no Estado de São Paulo, demonstrou-se a presença de rotavírus em 24 (16,66%) amostras através da técnica de PAGE, e em 39 (27,08%) amostras através da técnica de ELISA. Todos os 10 municípios envolvidos no estudo tiveram pelo menos 1 amostra positiva para este vírus, demonstrando a elevada ocorrência dos rotavírus nessas criações.

b) Houve uma concordância moderada entre as técnicas de PAGE e ELISA. A adoção destes dois testes em paralelo na etapa de triagem para a reação de PCR mostrou-se eficiente, contornando as limitações impostas pelos baixos valores de sensibilidade relativa entre as provas.

c) Utilizando-se a metodologia de PCR dirigida a genotipos mais freqüentes em animais, foi possível caracterizar o genotipo G[5] (30,23% do total de amostras genotipadas) como o de maior ocorrência em infecções singulares, seguido pelo G[10] (20,93%), e G[6] (4,65%). Em infecções simultâneas, caracterizou-se somente a associação G[5]+G[10] (18,6%). Utilizando-se a metodologia de PCR dirigida a genotipos mais freqüentes em humanos, caracterizou-se dentre as amostras, o genotipo G[4] (27,9%) como o de maior ocorrência em infecções singulares, seguido pelos genotipo G[3] (13,95%). A associações G[3]+G[4], G[2]+G[3]+G[4], e G[2]+G[3]

ocorreram, respectivamente em 9,3%, 4,65% e 2,32%. Utilizando-se a metodologia de PCR dirigida a genótipos mais frequentes em animais, caracterizou-se o genótipo P[6] (25,58%) como o de maior ocorrência em infecções singulares, seguido pelos genótipos P[1] (11,62%) e P[7] (9,3%). Caracterizaram-se as associações P[6]+P[7], P[1]+P[6], e P[1]+P[6]+P[7] em 9,3%, 4,65% e 2,32% das amostras, respectivamente. Utilizando-se a metodologia de PCR dirigida a genótipos mais frequentes em humanos, observou-se apenas o genótipo P[6] (65,11%) como o único genótipo detectado. Houve a predominância da ocorrência dos genótipos G[5]P[6] e G[4]P[6], porém foram detectadas infecções mistas, genótipos atípicos em suínos e "reassortants".

d) A identidade média de nucleotídeos de amostras pertencentes ao genótipo P[1] de 82%; entre o genótipo P[6], de 88% (valor máximo 100% e mínimo de 74%); e entre o genótipo P[7] de 92,3% (valor máximo de 93,3% e mínimo de 90,6%). A identidade média entre amostras pertencentes ao genótipo G[5] de 92,52% (valor máximo de 100% e mínimo de 87,1%); e entre o genótipo G[10], de 85,56% (valor máximo de 97,1% e valor mínimo de 73%). Foram detectadas substituições de nucleotídeos (e de aminoácidos) em amostras pertencentes um mesmo genótipo, o que a denota a existência de polimorfismos nos rotavírus circulantes nos municípios envolvidos no presente estudo.

e) Ficam propostas genealogias com base nas seqüências dos genes codificadores da VP4 (genótipos P) e da VP7 (genótipos G), segundo as quais elas formam grupos distintos mediante os genótipos caracterizados pela reação de PCR, e demonstra-se a circulação de pelo menos 2 diferentes grupos de amostras com genótipo P[6], P[7],

e G[5] em amostras fecais de leitões com diarreia provenientes de granjas localizadas no Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS²

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud, 1986. 989 p.

ALFIERI, A.; ALFIERI, A. F.; FREITAS, J. C.; SILVA, C. A.; FREIRE, R. L.; ARROS, A. R.; BARREIROS, M. A. B.; MULLER, E. E. Ocorrência de *E. coli*, Rotavírus, Picobirnavírus e Cryptosporidium em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **SEMINA (Ciências Agrárias)**, v. 15, n. 3, p. 5-7, 1994.

ALFIERI, A. F. **Caracterização dos genótipos G e P de rotavírus Grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela reação da Polimerase em cadeia**. 1999. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

APPLIED BIOSYSTEMS (Estados Unidos). ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer: User Guide Rev A3, 2001, 258 p.

BEARDS, G. M.; CAMPBELL, A. D.; COTTRELL, N. R.; PEIRIS, J. S. M.; REES, N.; SANDERS, R. C.; SHIRLEY, J. A.; WOOD, H. C.; FLEWETT, T. H. Enzyme-linked immunosorbent assays based on polyclonal and monoclonal antibodies for rotavirus detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 248-254, 1984.

BEER, M.; PEENZE, I.; MENDES, V.M.C.; STEELE, A.D. Comparision of electron microscopy, enzyme linked immunosorbent assay and latex agglutination for the detection of bovine rotavirus in faeces. **Journal of south African Veterinary Association**, v. 68, n.3, p. 93-96, 1997.

BELLINZONI, R. B.; MATTION, N. M.; MATSON, D. O.; BLACKHALL, J.; LA TORRE, J. L.; SCODELLER, E. A.; URASAWA, S.; TANIGUCHI, K.; ESTES, M. K. Porcine rotaviruses antigenically related to human rotavirus serotypes 1 and 2. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 633-636, 1990.

BERN, C.; GLASS, R. I. Impact of diarrheal diseases worldwide. In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 1-26.

² Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4.ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 p.

BISHOP, R. F. Natural History of human rotavirus infection. **Archives of Virology Supplement**, v. 12, p. 119-128, 1996.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, p. 1281-1283, 1973.

BITTENCOURT, M. J.; RÁCZ, M. L. Electrophoretic study of the genome of porcine rotaviruses from São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 23, p. 149-151, 1992.

BRIDGER, J. C.; WOODE, G. N. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by imunofluorescence and imune electron microscopy. **British Veterinary Journal**, v. 31, p. 528-535, 1975.

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

BROWN, A. J. L. Methods of evolutionary analysis of viral sequences In: MORSE, S. S. **The evolutionary biology of viruses**. New York: Raven Press, 1994. p. 75-84.

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

CASTRUCCI, G.; FERRARI, M.; FRIGERI, F.; TRALDI, V.; ANGELILLO, V. A study on neonatal calf diarrhea induced by rotavirus. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 17, n. 3-4, p. 321-331, 1994.

CIARLET, M.; ESTES, M. K. Interactions between rotavirus and gastrointestinal cells. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 435-441, 2001.

CIARLET, M.; PIÑA, C. I.; GARCÍA, O.; LIPRANDI, F. Identification of bovine rotaviruses in Venezuela: antigenic and molecular characterization of a bovine rotavirus strain. **Research on Virology**, v. 148, p. 289-297, 1997.

COLUCHI, N.; MUNFORD, V.; MANZUR, J.; VAZQUEZ, C.; ESCOBAR, M.; WEBER, E.; MÁRMOL, P.; RÁCZ, M. L. Detection, subgroup specificity, and genotype diversity of rotavírus strains in children with acute diarrhea in Paraguay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1709-1714, 2002.

CUCKOR, G.; BERRY, M. K.; BLACKLOW, N. R. Simplified radioimmunoassay for detection of human rotavirus in stools. **Journal of Infectious Diseases**, v. 138, p. 906-910, 1978.

CUNLIFFE, N. A.; BREESE, J. S.; HART, C. A. Rotavirus Vaccines: Development, current issues and future prospects. **Journal of Infection**, v. 45, p. 1-9, 2002.

DAGENAIS, L.; PASTORET, P. P.; SCHWERS, A.; KAECKENBEECK, A.; LANSIVAL, B.; ANTOINE, H.; JOASSIN, L.; CALBERG-BACQ, C. M.; JACQUEMIN, E. Epizootologie de la diarrhée à Rotavirus chez les bovins. **Annales de Médecine Vétérinaire**, v. 124, p. 565-575, 1980.

DAS, B. K.; GENTSCH, J. R.; CICIRELLO, H. G.; WOODS, P. A.; GUPTA, A.; RAMACHANDRAN, M.; KUMAR, R.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I. Characterization of rotavirus strains from newborns in New Delhi, India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 1820-1822, 1994.

DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of rotaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 46, p. 69-93, 1996.

DIWAKARLA, S.; CLARK, R.; PALOMBO, E. A. Expanding distribution of human serotype G6 rotaviruses in Australia. **Microbiology and Immunology**, v. 46, n. 7, p. 499-502, 2002.

DODET, B.; HESELTINE, E.; MARCY, C.; SALION, P. Rotaviruses in Humans and Veterinary Medicine. **Sante**, v. 7, n. 3, p. 195-199, 1997.

DOMINGO, E. Quasispecies theory in Virology. **Journal of Virology**, v. 76, n. 1, p. 463-465, 2002.

DOMINGO, E.; BARANOWSKI, E.; RUIZ-JARABO, C. M.; MATÍN-HERNÁNDEZ, A. M.; SÁIZ, J. C.; ESCARMÍS, C. Quasispecies structure and persistence of RNA viruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 521-527, 1998.

DURIGON, E. L.; CANDEIAS, J. A. N.; JEREZ, J. A.; BITTENCOURT, M. J.; ORTOLANI, E. L. Comparison of Staphylococcal co-agglutination with other assay for rapid diagnosis of rotavirus infection in humans, calves and piglets. **Journal of Virological Methods**, v. 35, p. 73-79, 1991.

EL-ATTAR, L.; DHALIWAL, C. R.; HOWARD, C. R.; BRIDGER, J. C. Rotavirus cross-species pathogenicity: molecular characterization of a bovine rotavirus pathogenic for pigs. **Virology**, v. 291, p. 172-182, 2001.

ELLENS, D. J.; DELEEUW, P. W. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 530-532, 1977.

ELLIS, G. R.; DANIELS, E. Comparison of direct electron microscopy and enzyme immunoassay for the detection of rotaviruses in calves, lambs, piglets and foals. **Australian Veterinary Journal**, v. 65, n. 5, 1988.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, P. M.; HOWLEY, P. M. **Field's virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1625-1655.

FALCONE, E.; TARANTINO, M.; TRANI, L.; CORDIOLI, P.; LAVAZZA, A.; TOLLIS, M. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3879-3882, 1999.

FERNELIUS, A. L.; RITCHIE, A. E.; CLASSICK, L. G.; NORMAN, J. O.; MEBUS, C. A. Cell culture adaptation and propagation of a reovirus-like agent of calf diarrhea from a field outbreak in Nebraska. **Arch Gesamte Virusforsch**, v. 37, p. 114-130, 1972.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. **Lancet**, v.2, p. 1497, 1973.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H.; WOODE, G. N.; BRIDGER, J. C.; DERRICK, J. M. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **Lancet**, v. 2, p. 61-63, 1974.

FUKAI, K.; MAEDA, Y.; FUJIMOTO, K.; ITOU, T.; SAKAI, T. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 343-349, 2002.

FUKAI, K.; SAKAI, T.; HAMATA, H. Distribution of G serotypes and P genotypes of bovine group A rotavirus isolated in Japan. Distribution of G serotypes and P genotypes of bovine group A rotavirus isolated in Japan. **Australian Veterinary Journal**, v. 76, n. 6, p. 418-422, 1998.

GATTI, S. M. V.; HARA, N. H.; FERRAZ, M. M. G.; PESTANA DE CASTRO, A. F. Presence of group A and non-A rotaviruses in neonatal piglets in Campinas, SP, Brazil. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 178, p. 347-349, 1989.

GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; WOOD, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B. K.; BHAN, M. K. Identification of group A rotavirus types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1365-1373, 1992.

GOUVEA, V.; ALLEN, J. R.; GLASS, R. I.; FANG, Z. Y.; BREMONT, M.; COHEN, J.; MCCRAE, M. A.; SAIF, L. J.; SINARACHATANENT, P. CAUL, E. O. Detection of Group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 519-523, 1991.

GOUVEA, V.; BRANDTLY, M. Is rotavirus a population of reassortants? **Trends on Microbiology**, v. 3, p. 159-162, 1995.

GOUVEA, V.; CASTRO, L.; TIMENETSKY, M. C.; GREENBERG, H. B.; SANTOS, N. Rotavirus serotype G5 associated with diarrhea in Brazilian children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1408-1409, 1994.

GOUVEA, V.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H. F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.

GOUVEA, V.; LIMA, R. C. C.; LINHARES, R. E.; CLARK, H. F.; NOSAWA, C.; SANTOS, N. Identification of two lineages (WA-like and F-45-like) within the major rotavirus genotype P[8]. **Virus Research**, v. 59, p. 141-147, 1999.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.5, p. 1338-1340, 1994a.

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M. C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.5, p. 1333-1337, 1994b.

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

GUERRANT, R. L.; KIRCHHOFF, L. V.; SHIELDS, D. S.; NATIONS, M. K.; LESLIE, J.; SOUSA, M. A.; ARAUJO, J. G.; CORREIA, L. L.; SAUER, K. T.; MCCLELLAND, K. E.; TROWBRIDGE, F. L.; HUGHES, J. M. Prospective study of diarrheal illnesses in Northeastern Brazil: Patterns of disease, nutritional impact, etiologies and risk factors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 148, n. 6, p 986-997, 1983.

GUSMÃO, R. H. P.; MASCARENHAS, J. D'A. P.; GABBAY, Y. B.; LINHARES, A. C. Nosocomial transmission of avian-like rotavirus strain among children in Belem, Brazil. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 12, p.129-132,1994.

HALL, G. A.; JONES, P. W.; MORGAN, J. H. Calf diarrhea. In: ANDREWS, A. H.; BLOWEY, R. H.; BOYD, H.; EDDY, R. G. **Bovine Medicine**. Diseases and husbandry of cattle. Oxford: Blackwell Scientific, 1992. p. 159-162.

HAYS, J. P.; MYINT, S. H. PCR sequencing of the spike genes of geographically and chronologically distinct human coronaviruses 229E. **Journal of Virological Methods**, v. 75, p.179-193,1998.

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.

HILLIS, D. M.; MABLE, B. K.; MORITZ, C. Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular systematics**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p. 515-543.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. **Journal of Health and Population Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 5-14, 2000.

HUSAIN, M.; SETH, P.; BROOR, S. Detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in feces from children with acute gastroenteritis. **Archives of Virology**, v. 140, p. 1225-1233, 1995.

HUSSEIN, H. A.; PARWANI, A. V.; ROSEN, B. I.; LUCCHELLI, A.; SAIF, L. J. Detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3 and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction-derived cDNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2491-2496, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE (Brasil). **Censo agropecuário 1995-1996**. Brasil, 1996. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/35/d35_t08.shtm>. Acesso em: 22 jun 2003.

ITURRIZA-GOMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D. W. G; DESSELBERGER, U.; GRAY, J. J. Comparision of specific and random priming in the reverse transcriptase polymerase chain reaction for genotyping group A rotaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 78, p. 93-103, 1999.

JANKE, B. H. Protecting calves from viral diarrhea. **Veterinary Medicine**, v. 84, n. 1, p. 803-810, 1989.

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

KANEENE, J. B.; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III - Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 127-140, 1990.

KANG, G.; GREEN, J.; GALLIMORE, C. I.; BROWN D. W. Molecular epidemiology of rotaviral infection in south Indian children with acute diarrhea from 1995-1996 to 1998-1999. **Journal of Medical Virology**, v. 67, n. 1, p. 101-105, 2002.

KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. N. Rotaviruses In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Field's virology**. 3. ed. Philadelphia: Linpcoot-Raven Publishers, 1996. p.1657-1708.

KIM, Y.; CHANG, K.; STRAW, B.; SAIF, L. Characterisation of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1484-1488, 1999.

KIM, Y.; NIELSEN, P. R.; HODGINS, D.; CHANG, K. O.; SAIF, L. J. Lactogenic antibody responses in cows vaccinated with recombinante bovine-like particles (VLPs) of two serotypes or inactivated bovine rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 20, p.1248-1258, 2002.

LEE, J. B.; YOUN, S. J.; NAKAGOMI, T.; PARK, S. Y.; KIM, T. J.; SONG, C. S.; JANG, H. K.; KIM, B. S.; NAKAGOMI, O. Isolation, serologic and molecular characterization of the first G3 caprine rotavirus. **Archives of Virology**, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-002-0963-7>>. Acesso em: 30 mar 2003.

LEITE, J. P. G.; ALFIERI, A. A.; WOODS, P. A.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Archives of Virology**, v. 141, p. 2365-2374, 1996.

LU, W.; DUHAMEL, G. E.; HOSHINO, Y.; BENFIELD, D. A.; NELSON, E. A.; HESSE, R. A. Characterization of the bovine group A rotavirus strain neonatal calf diarrhea virus-Cody (NCDV-Cody). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 990-994, 1995.

LUCCHELLI, A.; KANG, S. Y.; JAYASEKERA, M. K.; PARWANI, A. V.; ZEMAN, D. H.; SAIF, L. J. A Survey of G6 and G10 serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in ELISA. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, p. 175-181, 1994.

LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v. 3, p. 1145-1156, 2001.

MAES, R. K.; GROOMS, D. L.; WISE, A. G.; HAN, C.; CIESICKI, V.; HANSON, L.; VICKERS, M. L.; KANITZ, C.; HOLLAND, R. Evaluation of a human group A rotavirus assay for on-site detection of bovine rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 209-214, 2003.

MARKOWSKA, D. I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSAK, Z. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 219-232, 1996.

MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; GRECO, G.; TEMPESTA, M.; FERRARI, M.; LOSIO, M. N.; BUONAVOGLIA, C. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. **Journal of Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 1, p. 129-132, 2001.

MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; WILLBERG, P. **Veterinary epidemiology**. Iowa: The Iowa State University Press, 1987. 343 p.

MASCARENHAS, J. D.; PAIVA, F. L.; BARARDI, C. L.; GABBAY, Y. B.; SIMÕES, C. O.; LINHARES, A. C. Rotavirus G and P types in children from Northern Brazil, as determined by RT-PCR: occurrence of mixed P types infections. **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v. 16, n. 1, p. 8-14, 1998.

MATTHEWS, R. E. F. The classification and nomenclature of viruses. **Intervirology**, v. 11, p. 133-135, 1979.

MATTION, N. M.; COHEN, J.; ESTES, M. K. The rotavirus proteins. In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral Infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 169-249.

MAYR, A. New emerging viral zoonoses. **Veterinary Record**, v. 106, p. 503-506, 1980.

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

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método de máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. São Paulo: Holos, 2001. p. 97-107.

NAKAGOMI, O.; MOCHIZUKI, M.; ABOUDY, Y.; SHIF, I.; SILBERSTEIN, I.; NAKAGOMI, T. Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for transmission of animal rotaviruses to humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 1011-1013, 1992.

NAKAGOMI, T.; GENTSCH, J. R.; DAS, B. K.; KUMAR, R.; BHAN, M. K.; GLASS, R. I.; NAKAGOMI, O. Molecular characterization of serotype G2 and G3 human rotavirus strains that have an apparently identical electropherotype of the short RNA pattern. **Archives of Virology**, v. 147, p. 2187-2195, 2002.

NAKAGOMI, T.; TSUNEMITSU, H.; IMAGAWA, H.; NAKAGOMI, O. Genomic RNA constellation of recently emerging serotype G14 equine rotavirus strains in Japan that is highly homologous with prototype G3 and G14 strains previously identified in the United States of America. **Archives of Virology**, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00705-002-0967-3>>. Acesso em: 30 mar 2003.

OTTO, P.; SCHULZE, P.; HERBST, W. Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. **Archives of Virology**, v. 144, p. 2467-2473, 1999.

PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. S.; GENTSCH, J.; GLASS, R. I. Rotavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 561-570, 1998.

PARWANI, A. V.; HUSSEIN, H. A.; ROSEN, B. I.; LUCCHELLI, A.; NAVARRO, L.; SAIF, L. J. Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type-specific cDNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2010-2015, 1993.

PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S. Serological and Genomic Characterization of Porcine Rotaviruses in Thailand: Detection of a G10 porcine Rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p.1050-1057, 1996.

RÁCZ, M. L.; KROEFF, S. S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T. A. R.; DURIGON, E. L.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: Characterization of an Atypical genotype G[9] strain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2443-2446, 2000.

RADOSTITS, O. M.; ACRES, S. D. The control of acute undifferentiated diarrhea of newborn beef calves. **Veterinary Clinics of North America: Large Animals Practice**, v. 5, n. 1, p. 143-155, 1983.

RAMOS, A. P.; STEFANELLI, C. C.; LINHARES, R. E.; DE BRITO, B. G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; DE CASSIA LIMA, R.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology**, v. 71, p. 1-8, 2000.

RAO, C. D.; GOWDA, K.; REDDY, B. S. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses. **Virology**, v. 276, n. 1, p. 104-113, 2000.

RASOOL, N. B. G.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I. Determination of a universal nucleic acid extraction procedure for PCR detection of gastroenteritis viruses in faecal specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 100, p. 1-16, 2002.

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.; WICKNER, R. B. **Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses**. London: Academic Press, 2000. p. 421-433.

ROSALES, C. A. R. **Isolamento de rotavírus animais em cultura de células da linhagem MA-104 a partir de amostras fecais diarréicas**. 2001. 74 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SAIF, L. J.; ROSEN, B. I.; PARWANI, A. V. Animal rotaviruses. In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral Infections of gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 279-367.

SAN JUAN, C. S.; BELLINZONI, R. C.; MATTION, N.; LA TORRE, J.; SCODELLER, E. A. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. **Research Veterinary Science**, v. 41, p. 270-272, 1986.

SANTOS, N.; LIMA, R. C. C.; NOZAWA, C. M.; LINHARES, R. E.; GOUVEA, V. 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 8, p. 2734-2736, 1999.

SANTOS, N.; LIMA, R. C. C.; PEREIRA, C. F. A.; GOUVEA, V. Detection of rotavirus types G[8] and G[10] among brazilian children with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2727-2729, 1998.

SCHUDEL, A. A.; PASINI, M. I.; BARRENDEGUY, M. E.; CORNAGLIA, E.; GOTTSCHALK, M.; YAFAL, A. G.; FIJTAMAN, N.; GRODSINSKY, C.; SOZZI, M. **Manual de tecnicas para la identificacion de agentes infecciosos asociados a diarreas neonatales bovinas**. Castelar, FAO - Red. de Cooperation - Laboratorios Veterinarios de Diagnóstico [S.l.: s.n.], 1985. 75 p.

SCHWARZ, B. A.; BANGE, R.; VAHLENKAMP, T. W.; JOHNE, R.; MÜLLER, H. Detection and quantitation of group A rotaviruses by competitive and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 105, p. 277-285, 2002.

SEN, A.; KOBAYASHI, N.; DAS, S.; KRISHNAN, T.; BHATTACHARYA, S. K.; URASAWA, S.; NAIK, T. N. Amplification of various genes of human group B rotavirus from stool specimens by RT-PCR. **Journal of Clinical Virology**, v. 17, p. 177-181, 2000.

SNODGRASS, D. R.; FITZGERALD, T.; CAMPBELL, I.; SCOTT, F. M. M.; BROWNING, G. F.; MILLER, D. L.; HERRING, A. J.; GREENBERG, H. B. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 504-507, 1990.

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

SOLARTE, Y.; CORREA, A.; BARRERA, J.; MOGOLLON, D.; JERABEK, L.; GUTIERREZ, M. F. Molecular characterization of porcine rotavirus strains in Colômbia. **Online Journal of Veterinary Research**, v. 3, n. 2, p. 87-102, 1999.

STEELE, A. D.; PEENZE, I.; BEER, M. C.; PAGER, C. T.; YEATS, J.; POTGIETER, N.; RAMSAROOP, U.; PAGE, N. A.; MITCHEFF, J. O.; GEYER, A.; BOS, P.; ALEXANDER, J. J. Anticipating rotavirus vaccines: epidemiology and surveillance of rotavirus in South Africa. **Vaccine**, v. 21, p. 354-360, 2003.

TAN, S. W.; YAP, K. L. Mechanical transport of rotavirus by the legs and wings of *Musca domestica* (DIPTERA:Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 34, n. 5, p.527-531, 1997.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; PONGSUWANNA, Y.; CHOONTHANON, M.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S. Molecular and antigenic analyses of serotypes 8 and 10 of bovine rotavirus in Thailand. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2929-2937, 1991.

TANIGUCHI, K.; WAKASUGI, F.; PONGSUWANNA, Y.; URASAWA, T.; UKAE, S.; URASAWA, S. Identification of human and bovine rotavirus serotypes by polymerase chain reaction. **Epidemiology and Infection**, v. 109, n. 2, p. 303-312, 1992.

TIMENETSKY, M. C.; GOUVEA, V.; SANTOS, N.; CARMONA, R. C.; HOSHINO, Y. A. novel human rotavirus serotype with dual G5-G11 specificity. **Journal of General Virology**, v. 78, p.1373-1378,1997.

TORRES-MEDINA, A.; SCHLAFER, D. H.; MEBUS, C. A. Viruses as etiologic agents of neonatal calf diarrhea. **Veterinary Clinics of North America: Food and Animal Practice**, v. 1, n. 3, p. 471-493, 1985.

TSUNEMITSU, H.; MORITA, D.; TAKAKU, H.; NISHIMORI, T.; IMAI, K.; SAIF, L. J. First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene. **Archives of Virology**, v. 144, n. 4, p. 805-815, 1999.

VILLEGAS, G. A.; ARGÜELLES, M. H.; CASTELLO, A. A.; MAS, N. J.; GLIKMANN, G. A rapid method to produce high yields of purified rotavirus particles. **Journal of Virological Methods**, v.104, p. 9-19, 2002.

WELCH, A. B. Purification, morphology and partial characterization of a reovirus-like agent associated with neonatal calf diarrhea. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 35, p.195-202, 1971.

WHITE, R. G.; MEBUS, C. A.; TWIEHAUS, M. J. Incidence of herds infected with neonatal calf diarrhea virus (NCDV). **Veterinary Medicine**, v. 65, p. 487-490, 1970.

WIELER, L. H.; ILIEFF, A.; HERBST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLÖS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 48, p. 151-159, 2001.

WINIARCZYK, S.; PAUL, P. S.; MUMMIDI, S.; PANEK, R.; GRADZKI, Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, p. 373-378, 2002.

WOODE, G. N. Epizootiology of bovine Rotavirus infection. **Veterinary Record**, v. 103, p. 44-46, 1978.

XU, L.; HARBOUR, D.; MCCRAE, M. A. The application of polymerase chain reaction to detection of rotaviruses in faeces. **Journal of Virological Methods**, v. 27, p. 29-38, 1990.

YOLKEN, R. H.; WILDE, J. A. Assays for detecting human rotavirus. In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 251-278.

ANEXO

1 SOLUÇÕES EMPREGADAS NAS REAÇÕES DE PAGE

1.1 Dissociador da amostra

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

Nota: para preparo do padrão, preparar mistura dissociante com 3g de uréia em substituição ao glicerol.

1.2 Acrilamida / bis-acrilamida (50/1,3)

Reagente	Quantidade
Acrilamida	50,0 g
Bis-acrilamida	1,3 g
Água bidestilada	q.s.p. 100,0 mL

1.3 Lower TRIS 4x (1,5M TRIS/HCl; pH 8,8)

Reagente	Quantidade
TRIS (base)	18,17 g
HCl concentrado	q.s.p. pH 8,8
Água bidestilada	q.s.p. 100,0 mL

1.4 Upper TRIS 4x (0,5M TRIS/HCl;pH 6,8)

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

1.5 Persulfato de amônio (20 mg/mL)

Reagente	Quantidade
Persulfato de amônio	20 mg
Água bidestilada	q.s.p. 1,0 mL

1.6 Gel de poliacrilamida*

	Quantidade de Reagente	
	Gel de empilhamento (3,5%)	Gel de corrida (7,5%)
Solução mãe de Acrilamida/Bisacrilamida*	0,14 mL	1,02 mL
Lower TRIS 4x	-----	1,75 mL
Upper TRIS 4x	0,5 mL	-----
H ₂ O bidestilada	1,3 mL	4,02 mL
Persulfato de amônio	50 µL	200 µL
TEMED	10 µL	10 µL

*Solução-mãe de acrilamida/bis-acrilamida a 50/1,3, com C=2,53% (crosslinking).

1.7 Solução estoque TRIS-glicina 4x

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

1.8 Tampão de corrida

Reagente	Quantidade
TRIS-glicina 4x	60 mL
Água bidestilada	180 mL

1.9 Etanol-ácido acético

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

1.10 Solução reveladora

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

Nota: Adicionar o formaldeído quando o volume estiver próximo do volume total.

2 SOLUÇÕES EMPREGADAS NA REAÇÃO DE ELISA

2.1 Tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6

Reagente	Quantidade
Na ₂ CO ₃	0,85 g
NaHCO ₃	1,43 g
Água bidestilada	q.s.p. 500 mL

2. 2 Tampão de lavagem (PBS 0,01M pH 7,2 + 0,5% Tween 80 (v/v))

2.2.1 Solução A (mãe) de PO₄ 0,2M

Reagente	Quantidade
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	14,2 g
Água bidestilada	q.s.p. 500 mL

2.2.2 Solução B (mãe) de PO₄ 0,2M

Reagente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	26,9 g
Água bidestilada	q.s.p. 500 mL

2.2.3 NaCl solução mãe a 1,5 M

Reagente	Quantidade
NaCl	43,83g
Água bidestilada	q.s.p. 500 mL

2.2.4 Solução de uso - Tampão de lavagem

Reagente	Quantidade
NaCl solução mãe a 1,5 M	100 mL
Mistura das soluções A+B de PO ₄	14 mL solução A 36 mL solução B
Tween 80	5 mL
Água bidestilada	q.s.p. 200 mL

2.3 Solução cromógena

2.3.1 Solução A (mãe) de ácido cítrico 0,033M para substrato

Reagente	Quantidade
Ácido cítrico x H ₂ O	0,7 g
Água bidestilada	q.s.p. 100 mL

2.3.2 Solução B (mãe) de PO₄ 0,084M para substrato

Reagente	Quantidade
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	11,3 g
Água bidestilada	q.s.p. 500 mL

2.3.3 Tampão para substrato OPD

Reagente	Quantidade
Mistura das soluções A+B de PO ₄	13 mL solução A 12 mL solução B
OPD	10 mg
Perhidrol	10 µL

3 PRIMERS UTILIZADOS NA REAÇÃO DE PCR

3.1 Genotipagem P animal

Primer	Seqüência (5'→3')	Genotipo	Posição
Con3	TGGCTTCGCTCATTATAGACA	---	11-32
Con2	ATTTCGGACCATTATAACC	---	868-887
pNCDV	CGAACGCGGGGGTGGTAGTTG	1	269-289
pUK	GCCAGGTGTCGCATCAGAG	5	336-354
pOSU	CTTTATCGGTGGAGAATACGTCAC	7	389-412
pGOTT	GCTTCAACGTCCTTTAACATCAG	6	465-487
pB223	GGAACGTATTCTAATCCGGTG	11	574-594

3.2 Genotipagem P humana

Primer	Seqüência (5'→3')	Genotipo	Posição
1T-1	TCTACTTGGATAACGTGC	8	339-356
2T-1	CTATTGTTAGAGGTTAGAGTC	4	474-494
3T-1	TGTTGATTAGTTGGATTCAA	6	259-278
4T-1	TGAGACATGCAATTGGAC	9	385-402
5T-1	ATCATAGTTAGTAGTCGG	10	575-594

3.3 Genotipagem G animal

Primer	Seqüência (5'→3')	Genotipo	Posição
Beg9	GGCTTTAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	---	1-28
End9	GGTCACATCATACAATTCTAATCTAAG	---	1062-1036
End9UK	GGTCACATCATACAACCTCTAATCT	---	1062-1042
End9CRW8	GGTCACATCTAACAGCTTTAACCT	---	1062-1042
sBeg9	GGCTTTAAAGAGAGAATTTCT	---	1-21
FT5	CATGTACTCGTTGTTACGTC	5	779-760
DT6	CTAGTTCCTGTGTAGAATC	6	499-481
HT8	CGGTTCCGGATTAGACAC	8	273-256
ET10	TTCAGCCGTTGCGACTTC	10	714-697
BT11	GTCATCAGCAATCTGAGTTGC	11	336-316

3.4 Genotipagem G humana

Primer	Seqüência (5'→3')	Genotipo	Posição
9Con1	TAGCTCCTTTTAATGTATGG	---	37-56
9T1-1	TCTTGTCAAAGCAAATAATG	1	176-195
9T1-2	GTTAGAAATGATTCTCCACT	2	262-281
9T3P	GTCCAGTTGCAGTGTTAGC	3	484-503
9T-4	GGGTCGATGGAAAATTCT	4	423-440
9T-9B	TATAAAGTCCATTGCAC	9	131-147