RITA DE CÁSSIA LINARES

Ocorrência de rotaviroses em criações de suínos em diversos estados brasileiros

São Paulo

2012

RITA DE CÁSSIA LINARES

Ocorrência de rotaviroses em criações de suínos em diversos estados brasileiros

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada ás Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Jerez

Co-Orientadora:

Profª. Drª. Andrea Micke Moreno

São Paulo

2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2551
FMVZ

Linares, Rita de Cássia
Ocorrência de rotaviroses em criações de suínos em diversos estados brasileiros / Rita de Cássia Linares. -- 2012.
88 p.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez.

Co-orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Rotavírus. 2. Leitões. 3. Diarréias. 4. PAGE. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ocorrência de rotavirose em criações de suínos em diversos Estados Brasileiros", protocolado sob o nº 1553/2008, não utilizando animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Jerez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/11/2008.

We certify that the Research "Occurrence of rotaviruses in swine herds from Brazilian several states", protocol number 1553/2008, not using animals, under the responsibility Prof. Dr. José Antonio Jerez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/26/2008.

São Paulo, 26 de janeiro de 2012.

Denise Fantoni

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LINARES, Rita de Cássia

Título: Ocorrência de rotaviroses em criações de suínos em diversos estados brasileiros

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento:_____

AGRADECIMENTOS

Ao meu mais puro e verdadeiro amor;
João Gabriel

Aos meus pai,

João Linares Sanches

Nair Liberali Linares

Ao João Gabriel, o meu genuímo amor, a minha alegria e a minha razão, minha fonte de incentivo e força, muito obrigada, por sempre me alegrar e afastar o desânimo, por compreender todos os muitos momentos de ausência; e por a cada dia me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço aos meus familiares, meus pais, pelo apoio, suporte e carinho recebidos nos bons e difíceis momentos desse percurso, obrigada pelo constante incentivo, preocupação e infinito amor;

Á Deus, que em sua sabedoria soube me fazer paciente e incansável me dando forças para nunca desanimar;

A Ana Paula Duque da Silva, que sempre esteve ao meu lado desde o sonho até sua realização, meu muito obrigada, minha grande amiga por me fazer sentir sempre em casa, por toda a dedicação e amor;

A todos os meus amigos, em especial a Andréia Freire Perenha, e Rodrigo Corazza, que souberam entender as ausências, as faltas, obrigada pelos momentos de auxílio, incentivo e compreensão;

Ao amigo Alexandre Abelardo Sanches pela incessante ajuda, pela sabedoria, pelo incentivo, pelo apoio, pela grande amizade desde o início desta longa e árdua jornada, muito obrigada, por toda a dedicação;

A Sandra Abelardo Sanches, por toda paciência, nas infinitas caronas, meu muito obrigada;

Ao Prof. Dr. José Antonio Jerez, por toda a sua sabedoria, seu empenho, entusiasmo e por ter acreditado em mim desde o início, muito obrigada;

Ao Prof. Dr. Fábio Gregori, pela disposição em ajudar e elucidar as difculdades desta jornada;

A Prof[a]. Dr[a] Andrea Micke Moreno, pela co-orientação e total pronta ajuda, nos momentos mais difíceis, muito obrigada;

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Dra. Tania Allen Coutinho, Prof. Dr. Fábio Gregori, e ao Prof. Dr. José Antonio Jerez pelas valiosas e enriquecedoras contribuições;

A Jucélia de Jesus Pereira, Ana Paula Santos da Silva e Maria José Aparecida Louro, pela amizade e ajuda;

Aos colegas do curso de pós-graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada ás Zoonoses - VPS, pelo auxílio e incentivo;

Aos amigos do Laboratório de Sanidade Suína e Virologia; obrigada pela agradável convivência;

A Tânia Delonero pela total ajuda, pelo seu enorme coração, meu muito obrigada;

A toda a equipe do serviço de Normalização Bibliográfica da biblioteca Virginie Buff D´Apice, em especial á Elza Faquim, por toda a gentileza e dedicação dedicada a este trabalho;

Por fim agradeço a todos os docentes, funcionários e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

"Não basta conquistar a sabedoria, é preciso usá-la."

Cícero

RESUMO

RESUMO

LINARES, R. C. **Ocorrência de rotaviroses em criações de suínos em diversos estados brasileiros.** [Occurrence of rotaviruses in swine herds from brasilian several states]. 2012. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

As diarréias neonatais constituem-se em um dos mais importantes fatores econômico e sanitário nas granjas suínas, quer pela mortalidade, quer pelas perdas agregadas ao atraso no desenvolvimento dos leitões, à profilaxia e ao manejo. Os rotavírus ocupam lugar de destaque pela rápida disseminação dentro do plantel, bem como pelo potencial zoonótico, dada a probabilidade de rearranjo ou recombinação genética entre amostras humanas e animais O objetivo deste trabalho foi detectar a presença de rotavírus a partir de 277 amostras fecais de leitões com quadro clínico de diarréia, provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), Mato Grosso do Sul (MS), Mato Grosso (MT), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG) entre os anos de 2009 e 2011 e analisar o perfil eletroforético de migração dos segmentos genômicos bem como diferenças de eletroferótipos nas amostras positivas, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Das 277 amostras fecais diarréicas de leitões analisadas, 25 foram positivas (25/277= 9%). De conformidade com os Estados de origem, foram verificadas as frequências de 20% (1/5) no RS, 11,1% (1/9) em SC, 12,5% (1/8) no PR, 15,3% (6/39) em MS, 14,2% (3/21) em MT, 6,7% (5/74) em SP, 0% (0/7) no RJ e 7% (8/114) em MG. Pela análise da migração eletroforética dos segmentos genômicos, todas as 25 amostras positivas apresentaram perfil eletroforético compatível com o RV-A, tal como a amostra padrão NCDV com migração característica em quatro classes ou agregados [4-2-3-2]. Foram observadas pequenas diferenças na velocidade de migração de um ou mais segmentos dentro da mesma classe. Estes resultados evidenciam a importância da PAGE como metodologia de diagnóstico e de investigações epidemiológicas nas rotaviroses suínas.

Palavras-chave: Rotavírus. Leitões. Diarréias. PAGE.

ABSTRACT

ABSTRACT

LINARES, R. C. **Occurrence of rotaviruses in swine herds from brasilian several states.** [Ocorrência de rotaviroses em criações de suínos em diversos estados brasileiros]. 2012. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The neonatal diarrhea constitute one of the most important economic and health factors in pig farms either by death or by the aggregate losses to the delay in the development of piglets, prophylaxis and management. Rotaviruses have a prominent role by the rapid spread within the herd, as well as the zoonotic potential, given the likelihood of genetic reassortment or recombination between human and animal samples. The objective of this study was to detect the presence of rotavirus from fecal samples from 277 piglets with clinical cases of diarrhea, from the states of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC), Paraná (PR), Mato Grosso do Sul (MS), Mato Grosso (MT), São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Minas Gerais (MG) between the years 2009 and 2011 and to analyze the electrophoretic migration of genomic segments and electropherotype differences in positive samples, by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique. From 277 piglets diarrheal stool samples analyzed, 25 were positive (25/277 = 9%). In accordance with the States of origin, were observed frequencies of 20% (1/5) in the RS, 11.1% (1/9) in SC, 12.5% (1/8) in PR, 15.3 % (6/39) in MS, 14.2% (3/21) in MT, 6.7% (5/74) in SP, 0% (0/7) in Rio de Janeiro and 7% (8/114) in MG. For the analysis of the electrophoretic migration of genome segments, all 25 positive samples showed electrophoretic profile compatible with the RV-A as a standard sample NCDV, showing characteristic fourth class or aggregates [4-2-3-2]. We observed small differences in the migration speed of one or more segments within the same class. These results highlight the importance of PAGE as a method of diagnosis and epidemiological investigations in the porcine rotavirus.

Keywords: Rotavirus. Piglets. Diarrhea. PAGE.

LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Proteínas virais encontradas nos rotavírus: segmentos genômicos que as codificam, peso molecular, localização na partícula viral e principais características e funções 36

Quadro 2 - Demonstração esquemática do padrão de migração eletroforética dos segmentos de amostras dos RV-A a RV-G 41

Quadro 3 - Amostras de fezes diarreicas de leitões segundo o ano de colheita e o estado de origem 50

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma de rotavírus, RNA fita dupla, segmentado (esquerda) e as proteínas codificadas por cada segmento genômico (centro). Partícula de rotavírus representada esquematicamente (direita acima); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador 35

Figura 2 - Resultado da positividade por PAGE para a detecção de rotavírus em 277 amostras fecais diarréicas de leitões na faixa etária de um a quatro semanas, durante o período de 2009 – 2011- São Paulo- 2011 58

Figura 3 - Distribuição da ocorrência de positividade para rotavírus por PAGE, durante o período de 2009 – 2011, em amostras fecais diarréicas de leitões na faixa etária e uma a quatro semanas - São Paulo- 2011.....59

Figura 4 - Positividade para o rotavírus por PAGE em amostras fecais diarréicas de leitões na faixa etária de uma a quatro semanas, segundo o estado de origem e o ano de ocorrência - São Paulo- 2011 61

Figura 5 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE): perfil de migração eletroforético da amostra padrão NCDV [4-2-3-2] e de amostras de leitões positivas durante o período de 2009 a 2011 - São Paulo- 2011.....61

Figura 6 – Diversidade de eletroferótipos de RV-A observada por pequenas diferenças de migração eletroforética de um ou mais segmentos genômicos (1-11) dentro das quatro classes de migração (I, II, III e IV) - São Paulo – 2011 62

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da positividade para rotavírus por PAGE em amostras fecais diarréicas de leitões na faixa etária de uma a quatro semanas, segundo o estado de origem e o ano da ocorrência - São Paulo - 2011.....60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg = micrograma

µL = microlitro

$CaCl_2$ = cloreto de cálcio

cm = centímetro

cm^3 = centímetro cúbico

DEPEC = dietil-piro-carbonato

DMSO = dimetil-sulfóxido

DNAc = ácido desoxirribonucléico complementar

dsRNA = double-stranded RNA

et al. = e colaboradores

EDTA = ácido etileno-di-amino-tetra-acético

FMVZ = Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

g = aceleração da gravidadade terrestre (9,8 m/s^2)

g = grama

G = glicoproteína

HCl = ácido clorídrico

ICTV = International Committee on Taxonomy of Viruses

kDa = kilodalton

M = molar

mÂ= miliamper

MA_{104} = células renais de macaco Rhesus

MEM = meio mínimo de Eagle, sem soro fetal bovino

mg = miligrama

MG = Minas Gerais

min = minuto

mL = mililitro

mM = milimolar

MS = Mato Grosso do Sul

MT = Mato Grosso

N = normal

NaOH = hidroxido de sódio

NCDV = nebraska calf diarrhea virus

NCDR = nebraska calf diarrhea reovirus-like

nm = nanômetro

NSP = proteína não estrutural

ORF = open reading frame

P = protease

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS = solução tampão fosfato

pb = pares de base

PCR = reação em cadeia da polimerase

pM = picomolar

PR = Paraná

p/v = peso/volume

pH = concentração de hidrogênio iônico

q.s.p. = quantidade suficiente para

RJ = Rio de Janeiro

RNA = ácido ribonucleico

RS = Rio Grande do Sul

RT = transcrição reversa

RV-A = rotavírus do sorogrupo A

s = segundo

SC = Santa Catarina

SDS = dodecil sulfato de sódio

TE = tampão TRIS-EDTA

TEMED = tetra-metil-etilenodiamina

TRIS = hidroximetil-aminometano

U = unidade internacional

USA = Estados Unidos da América

USP = Universidade de São Paulo

V.A.S. = virus activation solution

VP = proteínal viral

VPS = Departameno e Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

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.

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTAS DE SÍMBOLOS

% = porcentagem

* = asterisco

‘’ = aspas

°C = graus Celsius

= igual

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....30
2 REVISÃO DA LITERATURA.....32
2.1 ROTAVÍRUS.....32
2.1.1 Histórico 32
2.1.2 Morfologia e estrutura.....34
2.1.3 Sorogrupos, sorotipos e genótipos.....38
2.1.4. Eletroferótipos.....40
2.1.5 Patogenia 42
2.1.6 Diagnóstico 43
2.1.7 Cadeia Epidemiológica 45
3 OBJETIVOS 48
4 MATERIAL E METODOS 50
4.1 AMOSTRAS 50
4.2 AMOSTRA PADRÃO.....51
4.2.1 Preparo da amostra padrão.....51
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE FEZES 52
4.3.1 **Extração do RNA viral (anexo A)** 52
4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).....53
4.4.1 Preparo de gel de poliacrilamida (anexo A) 53
4.4.2 Corrida eletroforética (anexo A).....54
4.4.3 Coloração com nitrato de prata (anexo A) 55
4.5 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....56
5 RESULTADOS.....58
6 DISCUSSÃO 64
7 CONCLUSÃO 72
REFERÊNCIAS.....74
ANEXO 85

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As diarréias neonatais constituem-se em um dos mais importantes fatores econômico e sanitário nas granjas suínas, quer pela mortalidade, quer pelas perdas agregadas ao atraso no desenvolvimento dos leitões, à profilaxia e ao manejo.

Diversos agentes, isolados ou associados, podem estar envolvidos na etiologia, acarretando um quadro clínico de diarréia aguda acompanhada de desidratação progressiva, acidose e morte. Entre eles, os rotavírus ocupam lugar de destaque pela rápida disseminação dentro do plantel, bem como pelo potencial zoonótico, dada a probabilidade de rearranjo ou recombinação genética entre amostras humanas e animais.

Assim, informações de ordem epidemiológicas são indispensáveis para o planejamento adequado das criações, visando à prevenção da infecção e o manejo sanitário sem impacto ambiental.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

A biosseguridade em suinocultura tornou-se uma tecnologia absolutamente primordial e essencial para a sobrevivência das explorações tecnificadas de suínos, todavia o confinamento em alta densidade, a taxa de crescimento forçada e o elevado grau de mecanização aumentam a necessidade de atenção mais detalhada à sanidade dos plantéis. Além disso, a intensificação do comércio, com maior movimentação de animais de uma região para outra, propicia uma situação favorável para a disseminação de vários patógenos e a ocorrência de surtos (SOBESTIANSKY, 2002; BEM SALEM et al., 2010).

Dentre os principais problemas de ordem sanitária e econômica, quer em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, destacam-se as diarréias, pois podem comprometer a viabilidade da criação devido à alta morbidade, mortalidade, redução no ganho de peso e custos de tratamento dos animais enfermos. Além disso, a que se considerar o impacto ambiental, pois agentes de diarréias podem ser eliminados através das fezes e contaminar cursos de água. A etiologia das diarréias é bastante complexa, uma vez que bactérias, parasitas e vírus, isolados ou associados, podem estar evolvidos em quadro clínico de diarréia aquosa, acompanhada de desidratação progressiva, acidose e morte. Os agentes etiológicos mais freqüentes são *Escherichia coli*, *Isospora suis*, *Clostridium perfringes*, *Cryptosporidium sp, Rotavirus* e *Coronavirus* (DRIESEN et al., 1993; DEWEY et al., 1995; CALDERARO et al., 2001; WIELER et al., 2001; DEWEY et al., 2003; WINTER; BRAUN; LIMA, 2005; ;BARCELLOS et al., 2008; VERHEYEN et al., 2009).

2.1 ROTAVÍRUS

2.1.1 Histórico

O primeiro relato de diarréia aguda humana tendo como provável causa os rotavírus foi realizado em 1943 por Light e Hodes, que isolaram um agente a partir

de um filtrado de fezes proveniente de crianças com diarreia aguda em Baltimore, USA e este agente ficou conhecido como Baltimore virus (LIGHT; HODES, 1943).

Mebus et al. (1969), a partir de material fecal diarréico, de bezerros inoculados com filtrado de fezes livre de bactérias e proveniente de um bezerro com quadro clínico de diarreia, detectaram ao microscópio eletrônico partículas virais de morfologia esférica. Inicialmente foram denominadas NCDV (Nebraska calf diarrhea virus) e, posteriormente, NCDR (Nebraska calf diarrhea reovirus-like), devido à semelhança morfológica com os reovírus. A detecção desses vírus em diversas propriedades de criação em diversos Estados (Nebraska, Dakota do Sul, Illinois e Califórnia) já fazia prever que deveriam ser ubiquitários.

Em 1973, Bishop et al. por meio de microscopia eletrônica, analizaram material de biópsias de mucosas duodenais de crianças com quadro clínico de diarréia aguda não bacteriana e encontraram partículas virais sugestivas de vírus pertencentes ao grupo dos orbivírus.

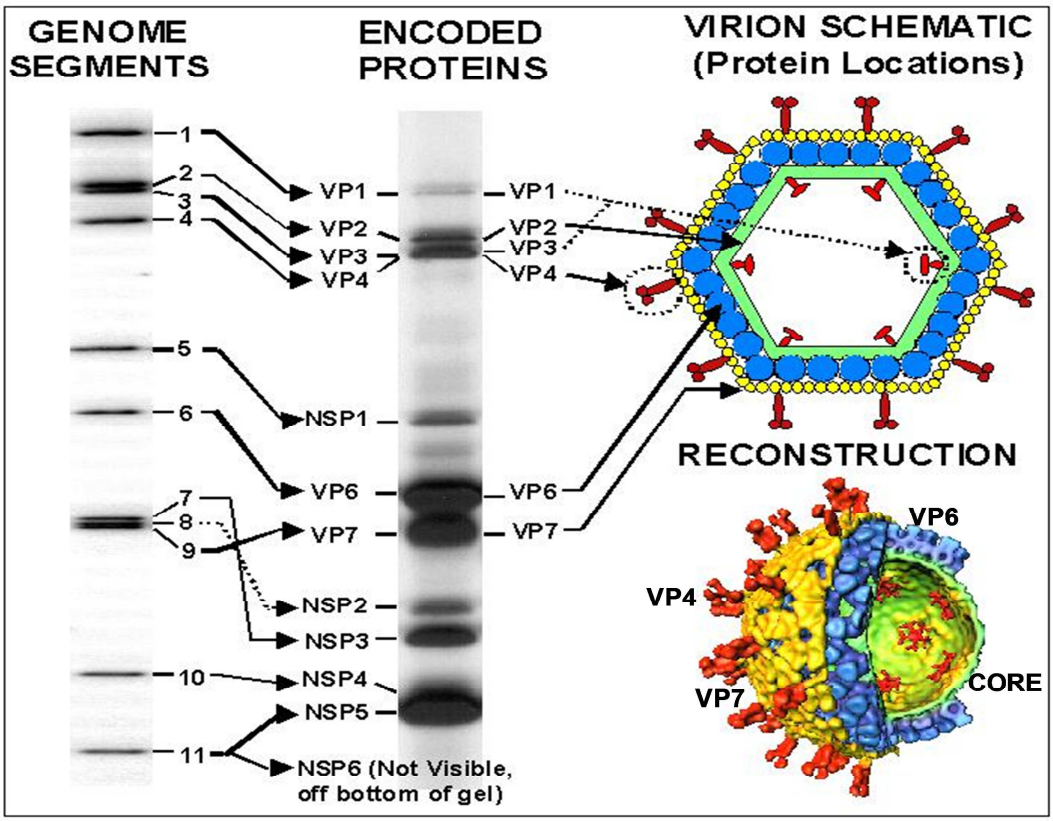
Flewett et al. (1973) encontraram, também por microscopia eletrônica, nas fezes de crianças com diarréia aguda, a presença de partículas virais com dupla camada de capsídeo, semelhante aos reovírus. No ano seguinte, 1974, Flewett et al. verificaram reações sorológicas cruzadas entre os vírus da gastroenterite infantil e os NCDR; dado o aspecto sugestivo das partículas virais à microscopia eletrônica propuseram a denominação Rotavírus (latim: *rota* = roda), que foi definitivamente aceita em 1976 pelo subcomitê internacional de taxonomia dos vírus, por ocasião do 4º Congresso Internacional de Virologia realizado em Madrid, Espanha (MATTHEUWS, 1979).

No Brasil, os rotavírus foram detectados pela primeira vez em 1976 em Bélem, PA, a partir de material fecal proveniente de crianças com gastroenterite (LINHARES et al., 1977). A partir daí, a importância e a relevância da presença dos rotavírus na etiologia das diarréias animais e na gastroenterite infantil tem sido assinalada.

2.1.2 Morfologia e estrutura

Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. A partícula viral completa mede, aproximadamente, 75 nm, não apresenta envelope e o nucleocapsídeo com simetria icosaédrica apresenta três camadas concêntricas: capsídeo externo, capsídeo interno e core, de aproximadamente 37 nm, que engloba o genoma. O genoma viral é constituído por um dsRNA (RNA de fita dupla) de polaridade positiva e segmentado; o peso molecular é de $2{,}0x10^5$ a $2{,}0x10^6$ daltons e contem 18552 pb e 11 segmentos, que variam entre 667 pb (segmento 11) e 3302 pb (segmento 1). Todos os segmentos são monocistronicos, com exceção do segmento 11 e contem informações importantes para a transcrição e montagem das partículas virais; são codificadas seis proteínas estruturais e seis proteínas não-estruturais (figura 1). Dentre as proteínas estruturais, duas estão localizadas no capsídeo externo (VP4 e VP7), uma no capsídeo interno (VP6) e quatro na região do core (VP1, VP2, VP3 e VP4). As seis não-estruturais (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4, NSP5 e NSP6), estão envolvidas em diversas funções, ainda pouco conhecidas, com exceção da NSP4, que parece ter uma função semelhante à enterotoxina. Outras proteínas podem ser resultados da clivagem de uma proteína precursora e nesse caso a denominação é feita adicionando-se um asterístico, após o número, como é o caso das proteínas VP5* e VP8*, que resultam da clivagem da proteína VP4. No quadro 1 é apresentado um resumo das proteínas virais e suas funções. (ANTONY et al., 1991; PRASAD; CHIU, 1994; VAN REGENMORTEL; FAUQUET; BISHOP, 2000; ESTES; KAPIKIAN, 2007; ICTV, 2011).

Figura 1 - Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma de rotavírus, RNA fita dupla, segmentado (esquerda) e as proteínas codificadas por cada segmento genômico (centro). Partícula de rotavírus representada esquematicamente (direita acima); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia associada ao processamento de imagem por computador.



Fonte: ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY,P.M. (Ed.) Fields Virology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 2001 (adaptado).

Quadro 1- Proteínas virais encontradas nos rotavírus: segmentos genômicos que as codificam, peso molecular, localização na partícula viral e principais características e funções.

Segmento Genômico	**Proteína**	**Peso molecular (nº de aa)**	**Localização na partícula viral**	**Características e funções**
1	VP1	125,005 (1088)	Core	RNA polimerase; ligação do dsRNA; complexo com VP3.
2	VP2	94,000 (880)	Core	Ligação do RNA ao interior do core; necessário a atividade de replicase da VP1.
3	VP3	88,000 (835)	Core	Guanilil e metil transferases; ligação do dsRNA; complexo com a VP1.
4	VP4 (VP5* + VP8*) VP5* VP8*	86,782 (776) 60,000 (529) 28,000 (247)	Cápsideo externo	Espícula de superfície do cápside externo; hemaglutinina. Sua clivagem por tripsina em VP5* e VP8* aumenta a infectividade. Antígeno de neutralização (soritipos / genotipos P). Proteína de adsorção envolvida na virulência.
5	NSP1	58,654 (495)	Não estrutural	Componente do pré-core. Maior diversidade intra-espécie. Região rica em cisteína (zinc finger) próxima ao resíduo aminoterminal.
6	VP6	44,816 (397)	Cápsideo interno	Proteina hidrofóbica; compõe o cápside interno em unidades triméricas. Possui determinantes antigênicos de grupo e subgrupo. Possível envolvimento na imunidade.
7	NSP3	34,600 (315)	Não estrutural	Associada ao citoesqueleto, liga-se especificamente à extremidade 3 dos RNAm dos rotavirus.

(Conclusão)

Segmento Genômico	Proteína	Peso molecular (nº de aa)	Localização na partícula viral	Características e funções
8	NSP2	36,700 (317)	Não estrutural	Possível papel na replicação do RNA. Forma multímeros associados a VP1, envolvidos na formação do viroplasma. Possui ligação não especifica ao dsRNA.
9	VP7 (1) VP7 (2) forma clivada madura	37,368 (326) 33,919 (297) 276	Cápsideo externo	Gene bicistrônico; alta glicosilação. Glicoproteina integral de membrana do RER; possível proteína de adsorção; antígeno de neutralização (tipos G); sitio putativo de ligação de Ca^{++}.
10	NSP4	20,290 (175)	Não estrutural	Glicoproteina trans-membrana do RER; papel na morfogênese; Considerada enterotoxina indispensável durante a infecção.
11	NSP5	21,725 (198)	Não estrutural	Proteína quinase, fosforilada; ligação com RNA. Interage com NSP2 e NSP6.
	NSP6	12,000 (92)	Não estrutural	Presente nos viroplasmas e na maioria das amostras. Interage com a NSP5.

Fonte: ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, P. M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. 5 ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.(Adaptado)

2.1.3 Sorogrupos, sorotipos e genotipos

Do ponto de vista antigênico e molecular, os rotavírus são classificados em sorogrupos, sorotipos e genótipos. Os determinantes antigênicos de sorogrupos estão relacionados à proteína VP6, localizada no capsídeo interno, formada por 260 trímeros e codificada pelo sexto segmento genômico. Tem peso molecular de 45 kda, contém 397 aminoácidos e representa cerca de 51% do virion. Até o presente momento são conhecidos sete sorogrupos, identificados pelas letras maiúsculas A, B, C, D, E, F e G, precedidos das iniciais, também maiúscula, RV, assim temos: RV-A, RV-B, RV-C, RV-D, RV-E, RV-F e RV-G (CONSTANTINE, 2007; ESTES; KAPIKIAN, 2007; MARTELLA et al., 2010; ICTV, 2011).

Os RV-A podem, ainda, apresentar subgrupos. Outrora os subgrupos I e II eram baseados no perfil de migração eletrofética dos segmentos genômicos 10 e 11; amostras com padrão eletroforético “curto” estavam associadas ao subgrupo I (maioria das amostras humanas) e amostras com padrão eletroforético “longo” associadas ao subgrupo II (maioria das amostras animais) (ESTES; GRAHAM e DIMITROV, 1984). Na atualidade, a distribuição em sorogrupos está relacionada, também, à proteína VP6 e pela reatividade com anticorpos monoclonais são conhecidos quatro subgrupos: SGI, SGII, SGI e II e SG nãoI-nãoII (ITURRIZA-GÓMARA et al, 2001; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A classificação dos RV-A em sorotipos leva em conta os determinantes antigênicos localizados no capsídeo externo, ou seja, as proteínas VP4 e VP7 (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP4, também, denominada proteína “P” (protease sensível e não glicolisada) é codificada pelo quarto segmento genômico e se projeta do capsídeo externo em forma de dímeros; tem peso molecular de 87 kda, contem 776 aminoácidos e representa cerca de 1,5% do virion. Está associada a várias funções importantes: infectividade viral, indução de anticorpos neutralizantes, atividade hemaglutinante, peptídeo de fusão e virulência. A sua clivagem proteolítica dá origem as proteínas VP5* e VP8*. A subunidade VP5* tem peso molecular de 60 kda e 529 aminoácidos; nela estão presentes os epitopos relacionados às funções de adsorção do vírus à célula e de neutralização heterotípica. A subunidade VP8* tem

peso molecular de 28 kda e 247 aminoácidos; nela estão presentes os epitopos associados às atividades de neutralização homotípica; as regiões de hipervariabilidade localizadas entre os aminoácidos residuais 71 e 24 e entre os de 84 e 180 estão correlacionadas aos sorotipos P dos RV-A (ESTES: COHEN; 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A proteína VP7, também denominada de proteína G (glicoproteina) é codificada pelos segmentos genômicos sete, oito ou nove, dependendo da amostra de RV-A. É a principal componente do capsídeo externo e representa cerca de 30% do virion; tem peso molecular de 45 kda e 397 aminoácidos; possui importante papel na codificação dos epítopos ligados à indução de anticorpos neutralizantes; apresenta seis regiões altamente conservadas e nove regiões variáveis. É a responsável pela determinação dos sorotipos G de RV-A (HOSHINO et al., 1985'ESTES; COHEN, 1989; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A classificação de sorotipos dos RV-A é realizada por um sistema binário que leva a conta as características antigênicas de VP7 e VP4, que são proteínas codificadas por diferentes segmentos genômicos. Os antígenos relacionados à VP7 são denominados G (glicoproteína) e os ligados a VP4 de P (protease); com base na reatividade sorológica foram identificados 14 sorotipos G classificados de G1 a G14 e 14 sorotipos P, classificados de P1 a P14 (GOUVEIA; SANTOS; TIMENETSKY, 1994ab, KAPIKIAN; CHANOCK, 1996). Alternativamente, pode-se empregar a caracterização molecular pela análise comparativa da sequência de aminoácidos codificados pelos segmentos genômicos da VP7 e VP4; para que uma amostra possa pertencer ao mesmo genótipo, deve apresentar pelo menos 89% de homologia (HOSHINO; KAPIKIAN, 1994; ESTES; KAPIKIAN, 2007). Com base na caracterização molecular até o presente momento já foram descritos 26 genótipos G e 33 genótipos P; para G, a relação entre sorotipo e genótipo já pode ser estabelecida, entretanto para P o resultado comparativo das duas metodologias é bastante imprecisa, por isso a nomenclatura dos genótipos P deve ser designada entre colchetes (por ex: P[1], P[2], P[3]....) (ESTES; KAPIKIAN, 2007; ICTV, 2011; MIYAZAKI et al., 2011).

Uma nova recomendação vem sendo proposta para a classificação dos RV-A pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus com base na análise comparativa da porcentagem de identidade da sequencia completa de nucleotídeos da fase

aberta de leitura (ORF – *open reading frame*) de todos os segmentos genômicos (ICTV, 2011). Assim, é bem provável que a nova nomenclatura deverá incluir além de G(VP7) e P(VP4), a nomenclatura dos genes codificadores das proteínas VP6, VP1, VP2, VP3, NSP1, NSP2, NSP3, NSP6 e NSP6 (MATTHIJNSSENS et al., 2008)

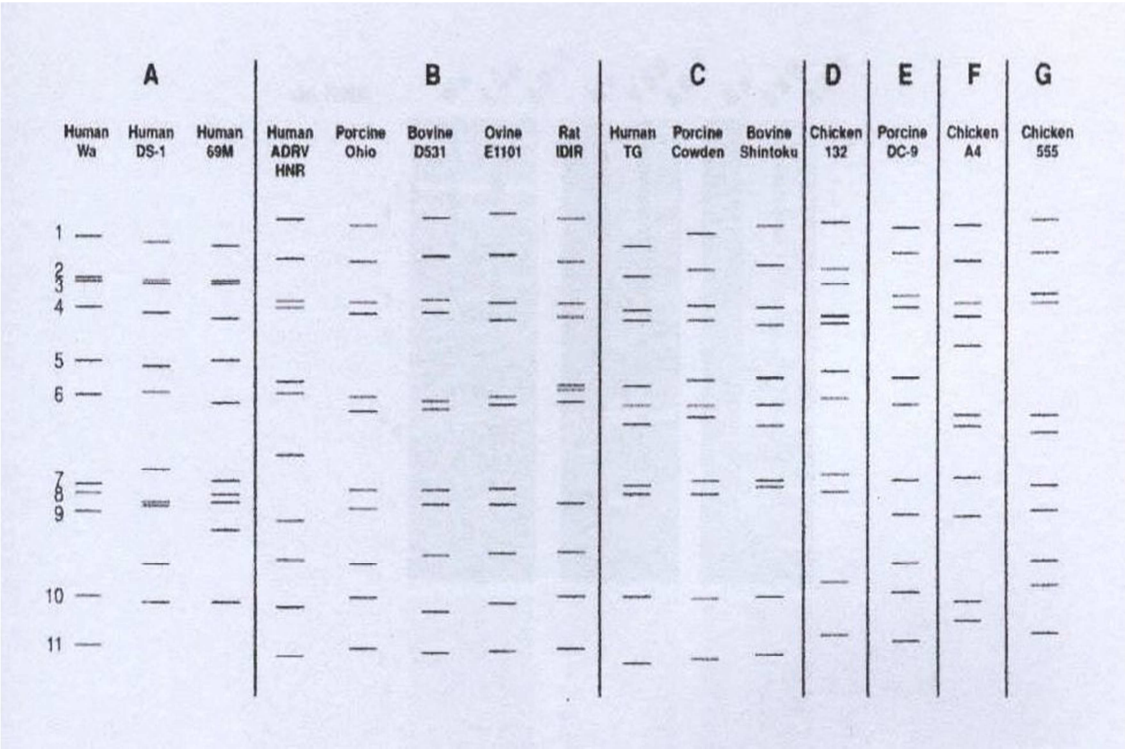
2.1.4. Eletroferótipos

Pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) o perfil de migração dos segmentos do dsRNA é conhecido como eletroferótipo e é bastante utilizado para caracterizar as amostras de RV (RODGER et al., 1981; ESTES; COHEN, 1989).

Os RV-A tem como eletroferótipo característico a distribuição dos onze segmentos em quatro classes ou agregados de migração [4-2-3-2], sendo elas: Classe I, segmentos 1, 2, 3 e 4; Classe II, segmentos 5 e 6; Classe II, segmentos 7,8 e 9, que migram em forma de *triplet*, dada a proximidade de suas massas moleculares; Classe IV, segmentos 10 e 11 e de conformidade com a velocidade de migração podem ser denominados de “curtos”, “super-curtos” e “longos”, sendo que a maioria das amostras animais enquadram-se no perfil “longo” (LOURENÇO; NICOLAS e COHEN, 1981; MATSUNO et al., 1985; TANIGUHI; URUSAWA, 1995).

Os RV que não apresentam este eletroferótipo [4-2-3-2] foram considerados atípicos ou não-grupo-A (PEDLEY et al., 1983; TODD; NcNULTY, 1986; McCRAE, 1987). Na atualidade, os diferentes perfis podem ser usados na identificação dos sorogrupos (Quadro 2), ou seja, RV-A → RV-G (ESTES; KAPIKIAN 2007; ICTV, 2011).

Quadro 2 - Demonstração esquemática do padrão de migração eletroforética dos segmentos de amostras dos RV-A a RV-G



Fonte: Kapikian et al. (2001)

Dentre os RV-A ocorre, ainda, diferença de migração eletroforética entre os segmentos que compõem cada uma das quatro classes de migração. Esta diversidade de eletroferótipos é bastante acentuada e provavelmente ocorra por três mecanismos relacionados à evolução entre as estirpes de RV-A: pontos de mutação (*drift*), rearranjo genômico (*shift)* e reestruturação genômica (*reassortment*), ou seja, rearranjo entre amostras distintas gerando uma nova amostra; dada as características do dsRNA e segmentado, este seria o principal mecanismo para a geração da diversidade genética dos RV-A (ESTES; GRAHAM; DIMITROV, 1984; ESTES; KAPIKIAN, 2007; MIYAZAKI et al., 2011).

Estudos epidemiológicos das infecções por rotavírus em todo o mundo demonstram transmissões zoonóticas e reassortments entre rotaviroses humanas e animais e a contribuição para a diversidade entre rotaviroses que infectam humanos. A mistura dos modelos humanos e animais contribuíram para uma potencial difusão de interespécies dos rotavírus (HOSHINO; KAPIKIAN, 2000; KANG et al., 2005; STEYER et al., 2008; BÁNYAI et al., 2009; HE et al., 2009; LASO et al., 2009;

COLLINS et al., 2010a; LAMHOUJEB et al., 2010; MARTELLA et al., 2010; MATTHIJNSSENS et al, 2010ab).

2.1.5 Patogenia

A porta de entrada principal é a via digestiva. Após a ingestão, as partículas virais são transportadas até o intestino delgado, no qual apresentam tropismo por enterócitos maduros das porções média e alta das vilosidades. A VP4 é a principal proteína envolvida na ligação com os receptores celulares; após a clivagem pela tripsina dá origem ás proteínas VP5* e VP8*, sendo que a entrada nas células, por endocitose, é mediada pela VP5* através das integrinas $\alpha_2\beta_1$ e $\alpha_4\beta_1$. Após esta etapa ocorre o desnudamento, isto é, a perda dos capsídeos externo e interno e a liberação do RNA do core para o citoplasma celular. No decorrer do mecanismo de replicação viral há atrofia das vilosidades, hipertrofia das criptas e dilatação mitocondrial; as microvilosidades vão sendo destruídas e como consequência ocorre perda na atividade das dissacaridases, promovendo aumento na osmolaridade. Além do comprometimento na digestão de açúcares, que cria um meio hipertônico, a situação agrava-se pelo aumento na concentração de íons de cálcio (Ca^{++}) intracelular, por ação da proteína não estrutural NSP4, que age como uma enterotoxina bacteriana, alterando a permeabilidade da membrana plasmática, aumentando a secreção de sódio, cloro e bicarbonato, fazendo com que haja maior perda de água no meio extracelular-lúmem, caracterizando uma diarréia osmótica. A lise das células degeneradas libera as partículas virais e o epitélio perdido é substituído por enterócitos cubóides e imaturos das criptas, podendo em casos graves, ser observado um epitélio plano (BISHOP et al., 1973; BALL et al., 1996; KAPIKIAN; CHANOCK, 1996; MOON, 1997; ESTES; MORRIS, 1999).

O período de incubação é de aproximadamente 24-48 horas e as infecções podem ser assintomáticas ou sintomáticas com variadas intensidades. A sintomatologia pode durar de três á oito dias, na dependência da dose infectante, estado imune do hospedeiro e da associação com outros agentes, que podem agravar o processo de diarreia e a desidratação, bem como influenciar os índices de

mortalidade. Há que se destacar que infecções assintomáticas podem estar contribuindo para o possível aparecimento de portadores e que no período agudo das infecções sintomáticas a eliminação fecal é bastante acentuada (LUNDGREN; SVENSSON, 2001; ESTES; KAPIKIAN, 2007).

2.1.6 Diagnóstico

Dada a similaridade de sintomatologia, o diagnóstico das rotaviroses suínas é feito por metodologias de diagnóstico laboratorial. As limitações que envolvem a metodologia convencional de cultivo e isolamento, aliada á grande quantidade de partículas virais eliminadas na fase aguda, permitiram o desenvolvimento de várias metodologias para a detecção dos rotavírus a partir de próprio material fecal. É importante, no entanto, que o material fecal seja colhido o mais breve possível após o aparecimento dos primeiros sintomas e ser enviado ao laboratório em condições de refrigeração (RAMOS et al., 2000; COLLINS et al., 2010b).

A microscopia eletrônica foi à primeira metodologia empregada (FLEWETT; BRYDEN; DAVIS, 1973), posteriormente a imunomicroscopia eletrônica melhorou a sensibilidade e especificidade (BRIDGER; WOODE, 1975). Apesar de importantes, o uso em rotina de diagnóstico laboratorial é inviável, devido ao alto custo do aparelho e o tempo envolvido no processamento das amostras.

Outros métodos de diagnóstico laboratorial foram desenvolvidos: contraimunoeletroforese, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático (ELISA), co-aglutinação com estafilococos, eletroforese em gel de poliacrialamida (PAGE) (HERRING et al., 1982; REYNOLDS et al., 1984; PEREIRA et al.,1985; DURIGON et al., 1991; BRANDÃO et al., 2002; JEREZ et al., 2002). Os métodos variam consideravelmente em sensibilidade, especificidade, facilidade de execução, tempo necessário para a conclusão dos resultados e custo final (MARKOWSKA et al.,1996; WINIARCZYK; GRADZKI, 2002).

A escolha do método deve levar em consideração, acima de tudo os objetivos pretendidos. Em algumas situações somente a detecção do agente pode ser o objetivo desejado, nas outras situações, além da detecção do vírus pode-se desejar

a identificação do sorogrupo, sorotipo ou genótipo (MARKOWSKA et al., 1996; SONG et al., 2006).

Os ensaios imunoenzimáticos tem sido o método mais empregado no diagnóstico laboratorial das rotaviroses. Apresenta alta sensibilidade e especificidade e é considerado de fácil execução e automação e permite analisar várias amostras simultaneamente (PEREIRA et al., 1985; GREGORI et al., 2000).

Há vários ensaios imunoenzimáticos disponíveis comercialmente para o diagnóstico laboratorial dos RV-A, que utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais direcionados á proteína VP6 (DENNEHY; GAUNTLETT; TENTRE, 1988; WINIARCZYK; GRADZKI, 2002).

O genoma segmentado, característico dos rotavírus, permitiu a utilização da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) na sua detecção. Desenvolvida inicialmente por Kalica et al. (1978), para diferenciar amostras humanas e animais, foi bastante simplificada por Herring et al. (1982) para facilitar o diagnóstico laboratorial das rotaviroses. Apesar da menor sensibilidade com relação aos ensaios imunoenzimáticos, tem como principal vantagem a detecção de todos os sorogrupos. Além disso, a análise do perfil eletroforético do dsRNA dos RV-A (YOLKEN; WILDE, 1994). Podendo fornecer importantes informações de significado epidemiológico, tais como demostrar a diferença ou semelhança de amostras envolvidas em diferentes surtos, a distribuição geográfica e sazonal de amostras e o acompanhamento do modo de transmissão. Quando se realiza o diagnóstico laboratorial dos RV-A, quer seja por meio de ensaio imunoenzimático ou PAGE, não se tem informação acerca do sorotipo envolvido. Assim ensaios imunoenzimáticos com anticorpos monoclonais foram desenvolvidos visando a sorotipagem (BEARDS et al., 1984; DIMITROV, 1984; COULSON, 1993; RAMIG, 1997; ESTES; KAPIKIAN, 2007;LINARES et al., 2009).

Na atualidade as metodologias biomoleculares como a transcrição reversa-reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) tem sido amplamente empregada para a detecção e caracterização de genótipos [G] e [P]. Apesar da elevada sensibilidade analítica da RT-PCR para a detecção de rotavírus em material fecal, quando comparada ao PAGE e ensaios imunoenzimáticos, pode ocorrer resultados falso-negativos em função de substâncias inibitórias presentes em material fecal, daí a necessidade de controle interno para a confiabilidade do teste e validação dos

resultados negativos (BUESA et al., 1996; WINIARCZYK; GRADZKI, 2002; MIYAZAKI et al., 2011).

Para a determinação dos genótipos [G] e [P] são usados iniciadores específicos e em leitões combinações usuais, não usuais e amostras não tipificáveis tem sido observada (GOUVEIA et al., 1990; GREGORI et al., 2009).

2.1.7 Cadeia Epidemiológica

A principal fonte de infecção são os leitões com diarreia sintomática que eliminam as partículas virais em altas concentrações. As matrizes e os animais adultos podem ser considerados portadores. Outras espécies tais como a bovina, podem ser apontadas como reservatórios. A principal via de eliminação é a fecal, contaminando água, alimentos e fômites. Como a principal via de transmissão é a forma indireta, a contaminação ambiental deve ser o principal alvo na profilaxia, uma vez que as partículas virais são relativamente resistentes a ação de raios-UV e do calor, podem permanecer viáveis no meio ambiente até, aproximadamente, seis meses. São estáveis em ampla faixa de pH ($3 \leq pH \geq 9$), resistentes aos solventes de lipídeos e sensíveis a maioria dos desinfetantes comerciais à base de hipoclorito de sódio, formol e iodóforos. A principal porta de entrada e a cavidade digestiva oral, através da ingestão de água e alimentos contaminados, embora a transmissão por aerossóis já tenha sido assinalada (MOE; SHIRLEY, 1982; DEWEY et al., 1985, 2003; STEYER et al., 2008; RUSTEMPASIC et al., 2011).

Medidas profiláticas de ordem específicas na proteção do suscetível por meio de vacinação têm sido tentadas. A imunização deve ser passiva, via colostral, uma vez na faixa etária de maior susceptibilidade os leitões ainda não imunocompetentes para secretarem anticorpos (SAIF; FERNANDEZ, 1996.)

O envolvimento direto dos rotavírus nos episódios de diarreia é demostrado pela frequência de detecção em inúmeros relatos em várias regiões do mundo. Com relação a rotavirose suína no Brasil, foi inicialmente relatada no Leste do Estado de São Paulo, região na qual se dá a maioria das informações a respeito da rotavirose,

onde foi encontrada em 84% das 19 propriedades rurais estudadas (SAN JUAN et al., 1986). Ainda no Estado de São Paulo, Gatti et al. (1989); Bittencourt e Rácz (1992); Calderaro et al. (2001) verificaram, respectivamente, frequência de positividade 84% e 31% e 10,9%. Gregori et al .(2009) em 16 criações comerciais distribuídas em 10 municípios verificaram 39,86% de positividade e diversidade de genótipos, com predominância do genótipo G[5] P[6].

Na região Sul do Brasil, Rácz et al. (2000) e detectaram 35,33% de positividade e a caracterização sorológica e molecular revelou genótipos mais frequentes do sorogrupo A, ao lado do genótipo atípico G[9].

Levantamentos epidemiológicos envolvendo várias regiões são escassos, Alfieri et al. (1991) relatou 26,4% de positividade em Estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Linares et al. (2009) nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso encontraram positividade para o sorogrupo A em 28,3% das propriedades, evidenciando a ampla distribuição das infecções por rotavírus nas propriedades de criação de suínos em nosso país.

Dada a diversidade de genótipos encontrados e a possibilidade de ocorrências de mutação, rearranjo genético e reestruturação genômica, que podem gerar novas amostras, as medidas profiláticas de ordem inespecíficas assumem papel de destaque na prevenção das rotaviroses suínas em criações industriais com confinamento em alta densidade, taxa de crescimento forcada e elevado grau de mecanização.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

GERAL

Detectar, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, a presença de rotavírus a partir de material fecal de leitões com quadro clínico de diarreia, provenientes de alguns Estados de diferentes regiões geográficas;

ESPECÍFICOS

Analisar o perfil eletroforético de migração das amostras positivas;

Avaliar a presença de diferentes eletroferótipos nas amostras pertencentes ao RV-A.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E METODOS

4.1 AMOSTRAS

Entre os anos de 2009 a 2011 foram analisadas 277amostras de fezes de leitões, na faixa etária de uma a quatro semanas, com quadro clínico de diarréia, provenientes de diversas propriedades de criação localizadas em oito Estados (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) pertencentes às três regiões geográficas (Sul, Centro-Oeste e Sudeste), onde se concentram a maior parte das granjas suínas no Brasil (Quadro 3).

Quadro3 - Amostras de fezes de leitões diarreicas segundo o ano de colheita e o estado de origem

ESTADOS	2009	2010	2011	TOTAL
RS	3	-	2	5
SC	9	-	-	9
PR	-	6	2	8
MS	8	23	8	39
MT	-	11	10	21
SP	33	38	3	74
RJ	-	7	-	7
MG	-	65	49	114
TOTAL	53	150	74	277

As amostras foram colhidas diretamente do reto, em sacos plásticos, ou em frascos de vidros (tipo “boca larga”) e enviadas em condição de refrigeração para o Laboratório de Sanidade Suína e Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Universidade de São Paulo (VPS-FMVZ-USP).

4.2 AMOSTRA PADRÃO

Foi utilizada como controle positivo a amostra padrão NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus) de rotavírus bovino, sorogrupo A, sorotipo G6P1, adaptada ao cultivo em monocamada de células da linhagem MA_{104} (rim fetal de macaco *Rhesus*), mantidas através de sucessivos repiques no Laboratório de Sanidade Suína e Virologia do VPS-FMVZ-USP.

4.2.1 Preparo da amostra padrão

▪ A amostra NCDV foi misturada na proporção 4:1(v/v) com V.A.S. (virus activation solution), contendo tripsina cristalina na concentração 5mg/mL;
▪ A mistura foi incubada em banho-maria a 37ºC por 30 minutos;
▪ 1 mL da mistura foi transferida para garrafas ($75cm^3$) contendo monocamada de cultura celular MA_{104} com 48 horas de crescimento e previamente lavada com P.B.S.;
▪ As garrafas foram incubadas em estufa 37ºC por 60 minutos, com agitação manual a cada 15 minutos, para facilitar a adsorção vírus-célula;
▪ Decorrido este período, a cada garrafa foi adicionado 9 mL de meio de manutenção (MEM - meio mínimo de Eagle, sem soro fetal bovino) contendo tripsina na proporção de 5µL/mL e as garrafas foram incubadas em estufa 37^0C, com acompanhamento do efeito citopático a cada 24 horas em microscópio óptico invertido;
▪ Uma vez observado o efeito citopático total, as garrafas foram congeladas em freezer a menos 20^0C, descongeladas e os conteúdos centrifugados a 3.000g para eliminação de restos celulares;
▪ O sobrenadante foi centrifugado a 100.000g, em ultracentrifuga refrigerada, durante 4 horas;

▪ O sobrenadante foi eliminado e o sedimento foi dissolvido em tampão dissociador de ácido nucléico e armazenado em geladeira, para o uso nas corridas eletroforéticas.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS DE FEZES

As amostras fecais foram preparadas em solução, na proporção de 25% (v/v), em tampão TRIS 0,1M pH 7,3 com agitação em vortex para a homogeneização e centrifugadas a 10.000g durante 30 minutos em centrifuga refrigerada, em temperatura de 4^0C. Decorrido este período, o sobrenadante foi recolhido e estocado em freezer a menos 20^0C até o momento da extração do RNA viral.

4.3.1 **Extração do RNA viral (anexo A)**

1ª Etapa:

▪ Pipetar 0,4 mL da suspensão fecal preparada de conformidade com o item 4.3. e adicionar 40 µL de SDS a 10%;
▪ Incubar durante 30 minutos em banho-maria a 37°C;
▪ Adicionar 0,2 mL de fenol destilado e 0,2 mL de clorofórmio;
▪ Incubar em temperatura ambiente durante 15 minutos, agitando a cada 5 minutos em vortex;
▪ Centrifugar a 1.030 g por 10 minutos;
▪ Transferir o sobrenadante para tubos tipo “Eppendorf” contendo 40 µL de NaCl a 20%;
▪ Adicionar 1,0 mL de etanol;
▪ Homogeneizar e incubar a menos 20°C por 18 horas.

2ª Etapa:

▪ Centrifugar a 30.000 g durante 30 minutos;
▪ Desprezar o sobrenadante;
▪ Deixar o tubo invertido sobre um papel de filtro, visando o esgotamento de todo o sobrenadante;
▪ Ressuspender o sedimento em 15 µL de dissociador da amostra fecal;
▪ Incubar 30 minutos em banho-maria a 37°C;
▪ Adicionar a amostra em uma das cavidades da placa de gel de poliacrilamida.

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A técnica de PAGE, seguida da coloração com nitrato de prata foi realizada segundo os procedimentos descritos por Herring et al. (1982), com algumas modificações. Foram utilizadas placas de vidro de 17 x 15 cm, espaçadores de 1,5mm e pente com 24 cavidades de 5 mm cada. Foi utilizado um gel de corrida a 7,5% e um gel de empilhamento a 3,5%.

4.4.1 Preparo de gel de poliacrilamida (anexo A)

▪ Limpar as placas de vidro, os espaçadores e o pente. Secar e passar álcool;
▪ Em posição horizontal, montar a placa, colocando os espaçadores sobre uma das placas; sobrepor a outra placa;
▪ Prender bem com os fixadores;
▪ Fazer com caneta permanente duas marcas 0,5 cm abaixo da extremidade inferior do pente;
▪ Colocar as placas montadas na posição vertical para receberem as soluções que darão origem ao gel de corrida e de empilhamento;

▪ Em um becker adicionar os componentes que darão origem à formação do gel de corrida 7,5% (“lower gel”) na seguinte ordem: 14 mL de água destilada, 4 mL da solução mãe de acrilamida/bis-acrilamida, 6,35 mL de tampão TRIS 1,5M, pH 8,8, 0,88 mL de persulfato de amônio e 50 µL de TEMED; homogeneizar bem;
(Observação: o persulfato de amônio deve ser preparado no momento do uso)
▪ Adicionar imediatamente a mistura à placa, até a marca de 0,5cm abaixo da extremidade inferior do pente;
▪ Aguardar de 15 a 30 minutos, aproximadamente, para a polimerização do gel de corrida;
▪Preparar o gel de empilhamento a 3,5% (“top gel”), misturando em um becker os componentes na seguinte ordem: 3,25 mL de água destilada; 0,35 mL da solução mãe de acrilamida/bis-acrilamida; 1,25 mL de tampão TRIS 0,5M pH 6,8, 0,15 mL de persulfato de amônio e 20 µL de TEMED; homogeneizar bem;
▪ Adicionar imediatamente acima do gel de corrida já polimerizado, colocar o pente e aguardar a polimerização;
▪Deixar a placa preparada de um dia para o outro.

4.4.2 Corrida eletroforética (anexo A)

▪ Fazer as marcações na placa vidro dos dentes do pente (cavidades);
▪ Soltar os fixadores da placa e retirar o pente com muito cuidado e bem devagar;
▪ Ajustar as placas na cuba e proceder a vedação com auxílio de ágar 1%;
▪ Adicionar tampão de corrida (tampão TRIS-glicina: TRIS 0,1M - glicina 0,83M) nos reservatórios da cuba vertical de eletroforese (aproximadamente 1.000mL); verificar se a vedação está correta, isto é, se não há vazamentos;
▪ Verificar a presença de bolhas na parte inferior da placa; se necessário retira-las com auxilio de seringa e uma agulha adaptada para esta função;
▪ Adicionar em cada cavidade 15µL de amostra;
▪ Reservar a primeira cavidade para o controle positivo (amostra NCDV, item 4.2.1.) e a ultima para o negativo (dissociador de ácido nucléico);

▪ Conectar, respectivamente, os pólos positivo e negativo a uma fonte de energia, ligar e ajustar a corrente elétrica para 35mÅ;
▪ Acompanhar a corrida através da migração do corante das amostras e verificar a necessidade de reajuste da corrente elétrica;
▪ Após a saída do corante pelo gel de corrida, deixar a fonte ligada por uma hora;
▪ Desligar a fonte e proceder a coloração do gel de corrida.

4.4.3 Coloração com nitrato de prata (anexo A)

▪ Desprezar o tampão de corrida e retirar a placa da cuba;
▪ Retirar os espaçadores laterais e separar uma placa de vidro da outra, com muito cuidado para não quebrar o gel;
▪ Eliminar o gel de empilhamento, com o auxilio de um dos espaçadores e referendar o gel de corrida com um pequeno corte na margem superior esquerda, onde deve estar o controle negativo;
▪ Remover o gel de corrida da placa de vidro, com auxilio de água destilada, transferindo-o para uma forma de pirex® de vidro; lavar duas a três vezes com água destilada;
▪ Eliminar a água destilada e adicionar o fixador (etanol-ácido acético), mantendo em agitação durante 45 minutos;
▪ Remover e adicionar a solução de nitrato de prata 0,011M, mantendo em agitação durante uma hora;
▪ Remover a solução anterior, lavar duas vezes com água destilada e adicionar o revelador (solução formol-hidróxido de sódio) bem devagar ao lado do gel e manter sob agitação até a visualização das bandas;
▪ Desprezar revelador e lavar duas vezes com água destilada e adicionar solução de ácido acético 5%, para parar a reação;
▪ Aguardar 20 minutos, remover a solução anterior e adicionar a solução de conservação do gel;
▪ Fazer a leitura do gel com auxílio de um transiluminador horizontal.

4.5 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Foram consideradas positivas para o sorogrupo A as amostras que apresentaram padrão eletroforético de migração compatível com o apresentado pela amostra padrão NCDV. Padrão de migração eletroforética não compatível com o sorogrupo A foram analisados para os demais sorogrupos.

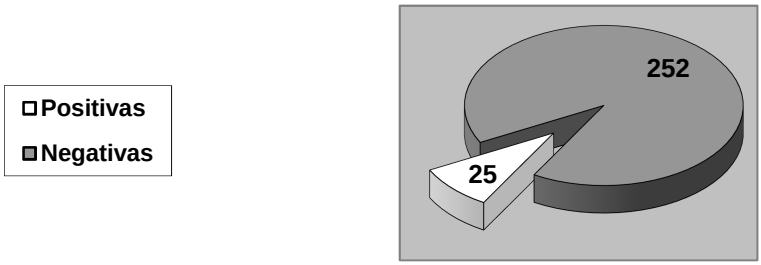
Nas amostras positivas, foram analisadas as possíveis variações quanto a diferença de migração eletroforética dos segmentos genômicos dentro de cada agregado de migração eletroforética característica do sorogrupo A (eletroferótipos).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Das 277 amostras fecais diarreicas de leitões analisadas por PAGE, 25 foram positivas (25/277= 9%) tal como ilustra a figura 2.

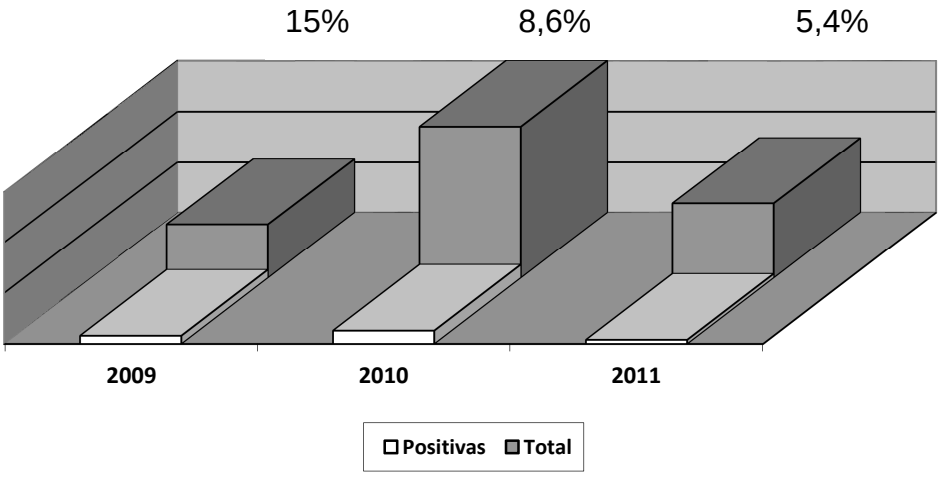
Figura 2 - Resultado da positividade por PAGE para a detecção de rotavírus em 277 amostras fecais diarreicas de leitões na faixa etária de um a quatro semanas, durante o período de 2009 – 2011- São Paulo- 2011



A distribuição da ocorrência de positividade no decorrer dos períodos compreendidos de 2009, 2010 e 2011 foi respectivamente de 15%, 8,6% e 5,4%, tal como ilustra a figura 3.

De conformidade com os estados de origem, foram verificadas as seguintes frequências: Rio Grande do Sul (RS) 20% (1/5), Santa Catarina (SC) 11,1% (1/9), Paraná (PR) 12,5% (1/8), Mato Grosso do Sul (MS) 15,3% (6/39), Mato Grosso (MT) 14,2% (3/21), São Paulo (SP) 6,7% (5/74), Rio de Janeiro (RJ) 0% (0/7) e Minas Gerais (MG) 7% (8/114). A distribuição segundo o ano de ocorrência e o estado de origem está apresentada na tabela 1 e figura 4.

Figura 3 - Distribuição da ocorrência de positividade para rotavírus por PAGE, durante o período de 2009 – 2011, em amostras fecais diarréicas de leitões na faixa etária e uma a quatro semanas - São Paulo - 2011



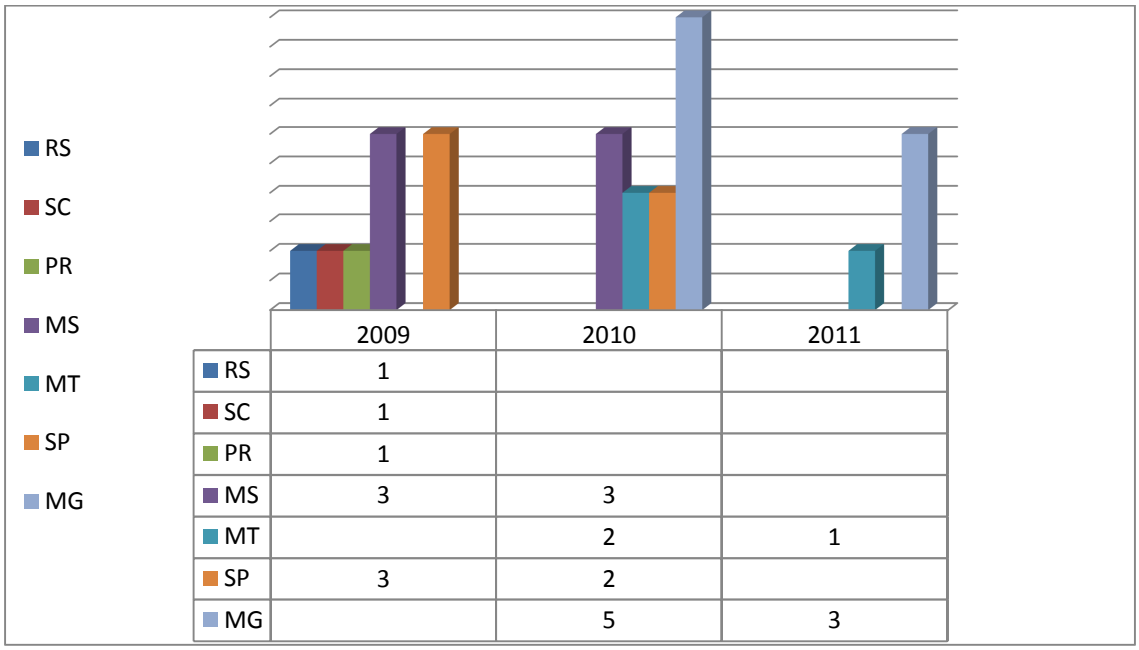
Ao se analisar a migração eletroforética dos segmentos genômicos, todas as 25 amostras positivas apresentaram perfil eletroforético compatível com o RV-A, uma vez que a comparação com a amostra padrão NCDV mostrou que os onze segmentos genômicos sempre se distribuíram nos quatro classes ou agregados de migração característico [4-2-3-2]. Figura 5.

Dentro do perfil eletroforético de migração em quatro classes, foi possível observar pequenas diferenças na velocidade de migração de um ou mais segmentos dentro da mesma classe, figura 6, revelando a diversidade de eletroferótipos dos RV-A existentes.

Tabela 1 - Distribuição da positividade para rotavírus por PAGE em amostras fecais diarréicas de leitões na faixa etária de uma a quatro semanas, segundo o estado de origem e o ano da ocorrência - São Paulo - 2011

	2009		2010		2011			
Estado	N° de amostras	N° de amostras positivas	N° de amostras	N° de amostras positivas	N° de amostras	N° de amostras positivas	Total de amostras	Total de amostras positivas
RS	3	1	-	-	2	-	5	1 (20%)
SC	9	1	-	-	-	-	9	1 (11,1%)
PR	-	-	6	1	2	-	8	1 (12,4%))
MS	8	3	23	3	8	-	39	6 (15,3%)
MT	-	-	11	2	10	1	21	3 (14,2%)
SP	33	3	38	2	3	-	74	5(6,7%)
RJ	-	-	7	-	-	-	7	-
MG	-	-	65	5	49	3	114	8 (7%)
Total	53	8	150	13	74	4	277	25

Figura 4 – Positividade para o rotavírus por PAGE em amostras fecais diarréicas de leitões na faixa etária de uma a quatro semanas, segundo o estado de origem e o ano de ocorrência - São Paulo - 2011



	2009	2010	2011
RS	1		
SC	1		
PR	1		
MS	3	3	
MT		2	1
SP	3	2	
MG		5	3

Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE): perfil de migração eletroforético da amostra padrão NCDV [4-2-3-2] e de amostras de leitões positivas durante o período de 2009 a 2011 - São Paulo - 2011

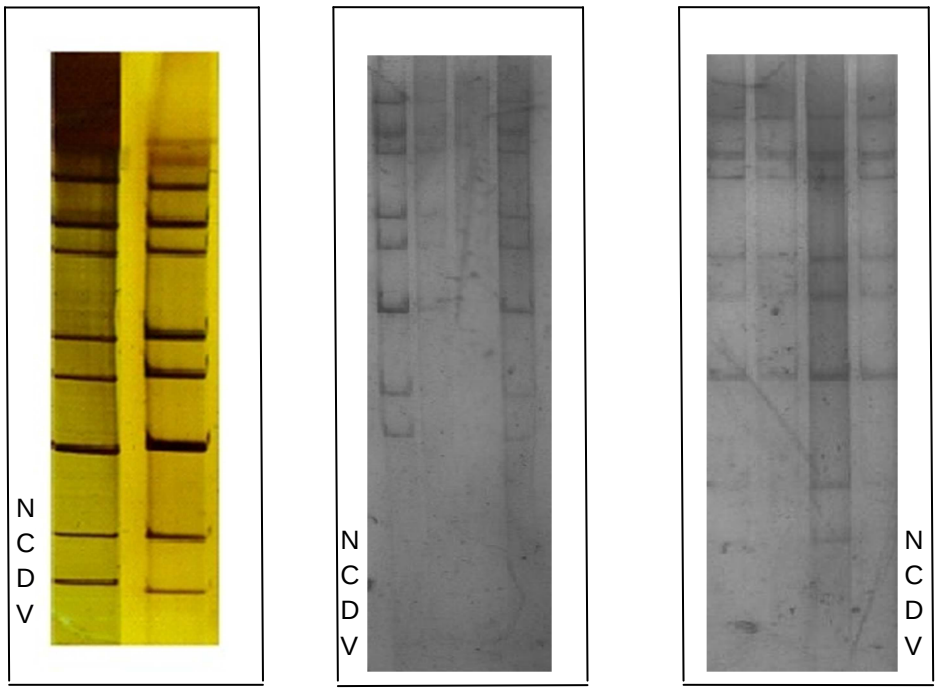
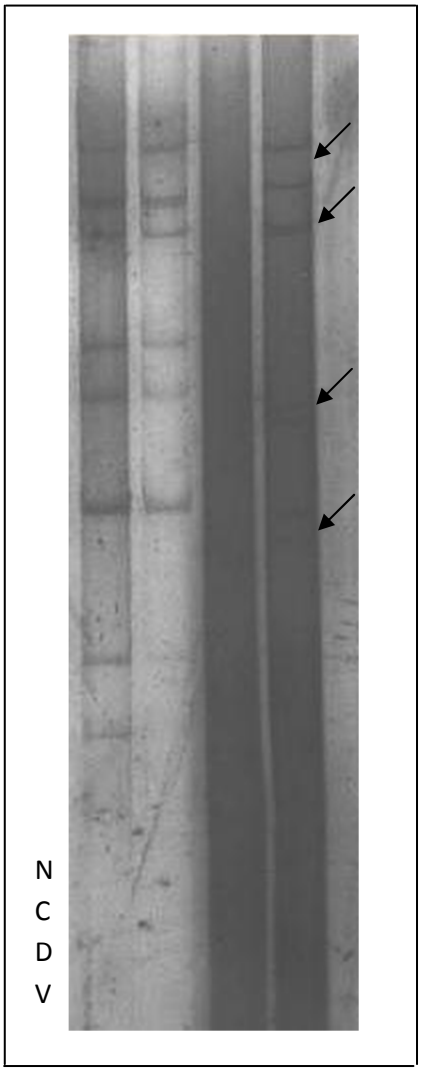


Figura 6 – Diversidade de eletroferótipos de RV-A observada por pequenas diferenças de migração eletroforética de um ou mais segmentos genômicos (1-11) dentro das quatro classes de migração (I, II, III e IV) - São Paulo – 2011



DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A suinocultura brasileira, através da organização da cadeia produtiva e da adoção crescente de tecnologia pelos produtores, vem se consolidando como uma atividade com alto potencial comercial. As atividades relacionadas à suinocultura ocupam lugar de destaque na matriz produtiva do agronegócio brasileiro, destacando-a como uma atividade de importância no âmbito econômico e social (BARCELLOS et al., 2008)

O crescimento da indústria suinícola nos últimos anos tornou clara e evidente a necessidade de uma maior e mais detalhada atenção à saúde dos plantéis. O aumento no tamanho dos sistemas de produção ocasionou um crescimento na densidade da população de animais em determinadas áreas geográficas, aumentando o risco de transmissão e manutenção de agentes infecciosos. A intensificação do comércio de animais de uma região para outra, criou uma situação ideal para a multiplicação e disseminação de vários patógenos (GONÇALVES; PALMEIRA, 2006; BARCELLOS et al., 2008).

As enterites são as causas mais comuns de mortalidade em leitões. A importância econômica dessas enterites se deve não só pela morte de leitões, mas principalmente pelas consequências negativas sobre o desenvolvimento, com surgimento de refugos e pelos excessivos gastos com medicamentos para seu controle. Dentre os agentes envolvidos destacam-se os rotavírus que são importantes patógenos e estão freqüentemente associados a surtos de diarréia sendo um dos principais agentes virais responsáveis por sua ocorrência (MORES et al., 1991; MORES; SOBESTIANSK; VIEIRA, 1995; GREGORI et al., 2009; LINARES et al., 2009).

As rotaviroses têm sido identificadas com alta freqüência na suinocultura, não só no Brasil, mas em todo mundo, ocorrendo preferencialmente nos períodos de lactação e pós-desmame (creche), cuja severidade varia em função dos níveis de contaminação ambiental, da imunidade das porcas e das condições de manejo e meio ambiente em que os leitões são mantidos (DEWEY et al., 1995; MORES et al., 1999;)

O presente trabalho avaliou um número expressivo de amostras fecais diarréicas de leitões provenientes de Estados distintos da Federação, localizados em regiões de grande concentração de criação de suínos, tal distribuição pode ser visualizada na tabela 1. A frequência obtida de 9% (figura 2) mostrou-se semelhante aos relatos de positividade de 4%, 10,9% e 16,6% respectivamente descritos por Calderaro et al. (2001), Gregori et al. (2009), Nhishida; Ruiz; Gregori (2009). Porém, estes achados mostraram-se inferiores aos citados por De San Juan (1986) em leitões de granjas do leste do Estado de São Paulo e Bittencourt; Rácz (1992) que obtiveram respectivamente, 22% e 32,1% de leitões positivos para rotavírus.

A maior positividade ocorreu no Rio Grande do Sul com 20% (tabela 1), região notoriamente conhecida pela tradição em suinocultura. A porcentagem de amostras positivas para o RV-A identificada nas amostras de fezes diarreicas de leitões avaliadas no presente estudo é próxima ou superior a descrita em outros levantamentos realizados no Brasil. Roehe et al. (1985), encontrou 10,1%, e posteriormente analisando amostras do RS e SC, a positividade de leitões chegou a 18,6% das amostras analisados (ROEHE, 1985, 1989). Estados como RS e SC, possuem positividade de até 31,1%, resultados estes que superam os descritos anteriormente. A hipótese mais provável para este elevado número é o fato de estas regiões possuírem uma suinocultura expressiva, e sabe-se que fatores ambientais e de manejo influenciam na sanidade de um plantel.

Estudos envolvendo vários estados são escassos, os resultados das análises se concentram na grande maioria no Estado de São Paulo e na região Sul do país, com frequências de diagnóstico que variam entre 4% á 84,6% (GATTI et al., 1989; NHISHIDA; RUIZ; GREGORI, 2009). Estados como PR e MG também apresentaram positividade compatível com as já descritas na literatura. No Brasil resultados discrepantes foram identificados embora a utilização de metodologias distintas para a identificação deste agente pode ter interferido na diferença entre os resultados encontrados, salientando que alguns estudos possuíam números relativamente baixos de amostras em poucas localidades estudadas. A avaliação de um número significativo de amostras é um aspecto muito importante para obter uma estimativa mais precisa da doença.

Estados como o MS e MT (tabela 1), que possuem sua suinocultura atualmente em expansão, não possuem informações a respeito da infecção por

rotavírus, sendo encontrados apenas dados agregados de várias regiões. Alfieri et al. (1991) com 26,4%, avaliou amostras pertencentes a vários estados brasileiros, Linares et al. (2009), obteve 28,3% de positividade em um número expressivo de amostras fecais diarreicas de leitões lactantes oriundas dos Estados do RS, SC, PR, MS e MT. O presente estudo identificou 15,3% e 14,2% no MS e MT, respectivamente. Esses dados sugerem que a instalação e ocorrência dos RV-A esta ocorrendo também nestes plantéis (tabela 1, figura 4).

Contudo os resultados encontrados em todos os estados, excluindo o RJ, em que nenhuma das amostras apresentou padrão de migração compatível com o rotavírus do sorogrupo A, vão de encontro com os relatos da literatura, onde demonstram que a ampla distribuição dos RV-A nos plantéis brasileiros esta estabelecida.

O diagnóstico de infecção por rotavírus é baseado na detecção da presença de partículas virais, seus antígenos ou seu dsRNA em material fecal, preferencialmente, em estágios iniciais da infecção. A PAGE é um método amplamente utilizado porque permite a detecção dos rotavírus de todos os sorogrupos. Além disso, nos rotavírus é possível verificar variações no comportamento eletroforético de diferentes amostras, o que faz com que sua utilização possa ser empregada tanto para diagnóstico laboratorial, como para estudos epidemiológicos (GATTI et al., 1989).

Embora a PAGE possua uma sensibilidade menor que outros métodos como RT-PCR e procedimentos imunoenzimáticos e não forneça dados sobre antigenicidade, deve-se ressaltar que a análise do perfil de migração eletroforético pela PAGE é uma característica útil para se distinguir diferenças entre estirpes e fornecer informações sobre o significado epidemiológico da variação genômica dos rotavírus. Essa habilidade de detecção de rotavírus de todos os sorogrupos, bem como a variabilidade de eletroferótipos dos RV-A, permite uma vigilância na detecção de novos ou diferentes sorotipos (genótipos) (BITTENCOURT; RACZ, 1992; PONGSUWANNE et al., 1989; BUZINARO; FREITAS, 2002).

A diversidade em nossos achados eletroforéticos (figura 6), pode indicar uma considerável diversidade gênica dos RV-A. A co-circulação de diferentes RV-A em um mesmo plantel tem sido relatada em vários estudos (BARREIROS et al., 2003; COLLINS et al., 2010a). A esse respeito à literatura tem constatado que quanto há

diversidade gênica dentro de um plantel, a introdução de novas amostras de RV-A ou a possibilidade de *reassortment* entre elas pode estar ocorrendo (MIYAZAKI et al., 2011). Miyazaki et al. (2011) utilizando a PAGE relatou seis diferentes eletroferótipos, correspondentes a diferentes surtos ocorridos em uma mesma propriedade, tal evidencia foi confirmada com o auxilio da ferramenta molecular, resultante em um novo G 26. Estes dados são compatíveis com outros estudos que desde as primeiras investigações vem salientando as diferenças de migração dos segmentos genômicos dos rotavírus suínos sorogrupo A detectados por PAGE, como possíveis infecções simultâneas ou recombinações, indicando uma considerável diversidade gênica (GATTI et al., 1989; BITTENCOURT; RACZ, 1992; PONGSUWANNE et al., 1989; BUZINARO; FREITAS, 2002). A diversidade eletroferotípica observada em algumas amostras nos indica que a atual situação dos rotavírus em circulação esta sempre se modificando.

As amostras do presente trabalho englobaram a faixa etária de 1 a 4 semanas de idade, não foi possível estratificar a positividade, sendo encontrados animais positivos em todas as faixas etárias. Tal fato acontece no período de maior susceptibilidade dos leitões as infecções por rotavírus, pois coincide com eventos fisiológicos do leitão e da matriz. Os neonatos são considerados imunodeficientes e há vários fatores que contribuem para a imunodeficiência neonatal como a baixa quantidade de linfócitos B no sangue, baixa expressão de MHC II (*Major Histocompatibility Complex*) e alta concentração de cortisol no sangue do leitão. Contribuem com esta situação, além dos fatores citados, o fato de a atividade imune na mucosa intestinal do suíno não estar completamente desenvolvida até quarta e sétima semanas de idade, e associado a este período ocorre também a mudança de dieta dos leitões, de líquida para sólida juntamente com o estresse do desmame (WESTRON et al., 1985; GASKINS; KELLEY, 1995; LINARES et al., 2009).

Nas porcas as concentrações de imunoglobulinas presentes no colostro variam drasticamente nas primeiras 24 horas após o parto. O declínio no título de anticorpos passivos, distúrbios da lactação, baixo título de anticorpos no leite, interferem na qualidade e quantidade de anticorpos adquiridos pelo leitão. A quantidade de anticorpos é restrita devido à variedade de antígenos com os quais a porca teve contato durante sua vida, consequentemente, fêmeas mais velhas

conferem uma maior proteção em quantidade e qualidade de imunoglobulinas que as fêmeas primíparas (BLECHA, 1998).

Porcas que recebem imunização antes do parto podem incrementar essa transferência de imunidade passiva. Embora em algumas condições em que ocorram práticas de manejo inadequadas, a imunização pode ter sua eficácia reduzida desencadeando falhas nestes títulos (BLECHA, 1998).

O consumo inadequado do colostro nas primeiras 24 horas após o nascimento interfere drasticamente na proteção dos leitões contra a infecção pelos rotavírus. Sabe-se que a máxima absorção de imunoglobulinas ocorre de 4 a 12 horas após o nascimento e declina rapidamente até o fechamento das vilosidades intestinais com 48 horas de vida. O leitão recém-nascido é dependente do balanço entre imunidade passiva e ativa durante as primeiras semanas de vida. Porém a ocorrência de positividade em todas as faixas etárias estudadas sugere que provavelmente fatores ligados aos parâmetros zootécnicos de produtividade tenham falhado e proporcionado uma situação de maior risco sanitário também nessas faixas etárias (BLECHA, 1998).

É sabidamente conhecido que os suínos infectados com rotavírus desenvolvem resposta imune intestinal e sistêmica. Animais que se recuperam de infecções por rotavírus adquirem imunidade homotípica, mas não heteróloga. Após a infecção ou vacinação oral a resposta de anticorpos específicos é predominantemente contra a proteína de capsídeo VP6. Anticorpos contra a VP6 não são suficientes para proteger contra as rotaviroses. Entre os distintos sorotipos e sorogrupos, a proteção cruzada após a primeira infecção ou vacinação é mínima ou inexistente, mas repetidas infecções ou vacinações, até mesmo com as mesmas amostras de rotavírus, ampliam a proteção heterotípica. A divergência antigênica presente entre diferentes sorotipos e sorogrupos dos rotavírus representa um desafio pra o desenvolvimento de imunógenos capazes de induzir proteção heterotípica (BLECHA, 1998).

Considerando-se a diversidade de rotavirus já detectada em território nacional, medidas profiláticas de ordem específicas devem levar em conta, para a sua efetividade, o grau de proteção cruzada conferido pelos genótipos presentes nas formulações vacinais. Uma vacina ideal e aquela capaz de reproduzir a resposta imune gerada por uma infecção natural. As vacinas comerciais são avaliadas pela

medida de anticorpos no colostro e no leite (IgG e IGA). Na rotavirose a imunidade passiva não esta ligada apenas aos anticorpos séricos, pois depende também da resposta imune ao nível de mucosa (IGA). Como a mensuração de IGA secretória e metodologicamente muito difícil, a sua aplicação tem não sido encorajada, apesar da sua comprovada eficiência na proteção (BLECHA, 1998).

Na ausência de marcadores de proteção associados à imensa variabilidade de genótipos até aqui detectados, a metodologia de PAGE revela-se de uma utilidade incomensurável na epidemiologia e profilaxia da rotavirose suína.

Com estas informações, se torna ainda mais evidente a importância de medidas profiláticas de ordem inespecífica, em primeiro lugar o manejo, para proporcionar uma melhor condição ao animal frente ao desafio de infecção. É fundamental para o sucesso de qualquer programa profilático o controle da limpeza, vazio sanitário, desinfecção, higiene, nutrição e ambiente seco. Em condições de confinamento, a frequência e severidade das doenças estão diretamente relacionadas ao nível de contaminação ambiental e esta, por sua vez, está relacionada ao sistema de manejo das instalações e ao programa das medidas profiláticas. Um programa envolvendo medidas profiláticas de ordem inespecífica se torna primordial dentro do conjunto de práticas de manejo presentes nas granjas com suinocultura industrial.

A suinocultura é uma atividade com alto potencial poluidor, devido à grande produção de dejetos associada ao modo intensivo de criação. O modelo atual da produção de suínos no Brasil é regido por parâmetros de produção que, para o sucesso da atividade, devem ser rigorosamente monitorados e alcançados a cada ciclo de produção. Dentre os vários parâmetros zootécnicos de produção, o número de leitões desmamados/porca/ano é um importante indicador do desempenho da atividade. Esse parâmetro pode ser influenciado negativamente por vários fatores relacionados ao manejo, nutrição e sanidade do rebanho (DEWEY et al., 1995, 2003). No entanto é necessário melhorar o processo de produção, industrialização e manejo dos dejetos produzidos, uma vez que, são altamente poluentes e causam danos ao meio ambiente (MOREJON, et al., 2003).

O potencial zoonótico dos RV-A é uma grande preocupação atualmente, e tem sido relatado em várias ocasiões. O estudo da rotavirose animal é fundamental pra se entender melhor a ecologia e os mecanismos que a rotavirose envolve, mas

também é importante para a melhoria das medidas profiláticas. Bovinos e suínos podem ser considerados reservatórios para a diversificação dos RV- humanos. RV-A com G genótipos incomuns, notoriamente achados em suínos e bovinos tem sido detectados esporadicamente e epidemicamente em casos de diarreias em humanos em populações da América Latina, Ásia, Europa e África (STEYER et al., 2008; BÁNYAI et al, 2009; GALLIMORE et al., 2008).

De maneira geral, a preocupação com a contaminação ambiental está demonstrada em inúmeros trabalhos desde o continente Africano, Europa, Ásia, América do Norte e América do Sul (BORCHARDT; HAAS; HUNT, 2004; LODDER; HUSMAN, 2005; HE et al., 2009; VERHEYEN, et al., 2009; GRASSI et al., 2010; ZIEMER et al., 2011). No Brasil os relatos vão desde Manaus, Amazônia até São Paulo (MIAGOSTOVICH et al., 2008; NHISHIDA; RUIZ; GREGORI, 2009).

Dessa forma, a vigilância epidemiológica contribui para o melhor entendimento da saúde do plantel, partindo do conhecimento dos fatores que a determinam e provendo, consequentemente, subsídios para a prevenção das rotaviroses.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- A detecção de rotavírus em 9% das amostras analisadas, evidencia que este agente etiológico da diarréia dos leitões está bastante disseminado no plantéis de criação localizados em vários estados brasileiros;

- Todas as amostras positivas exibiram na PAGE perfil eletroforético de migração característico dos RV-A;

- A PAGE pode ser considerada uma metodologia das mais importantes para o diagnóstico laboratorial das rotaviroses suínas e para investigações epidemiológicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; CONTE, L. E.; RESENDE, M. Evidências do envolvimento de rotavírus nas diarréias do pré e pós-desmame dos suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v.43, p. 291-300, 1991**.**

ANTHONY, I. D.; BULLIVANT, S.; DAYAL, S.; BELLAMY, A. R.; BERRIMAN, J. A. Rotavirus spike structure and polypeptide composition. **Journal of Virology,** v. 65, p. 4334-4340, 1991.

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

BÁNYAI, K.; ESONA, M. D.; KERIN, T. K.; HULL, J. J.; MIJATOVIC, S.; VÁSCONEZ, N.; TORRES, C.; DE FILIPPIS, A. M.; FOYTICH, K. R.; GENTSCH, J. R. Molecular characterization of a rare, human-porcine reassortant rotavirus strain, G11P[6], from Ecuador. **Archives of Virology,** v. 154, p. 1823 -1829, 2009.

BARCELLOS, D. E. S. N.; MORES, T. J.; SANTI, M.; GHELLER, N. B. Avanços em programas de biosseguridade para a suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36 p. 33-46, 2008.

BARREIROS, M. A.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; LEITE, J. P. An outbreak of diarrhoea in one-week-old piglets caused by group A rotavirus genotypes P[7], G3 and P[7], G5. **Veterinary Research Commununication,** v. 27, p. 505-512, 2003.

BEARDS, G. M.; CAMPBELL, A. D.; COTTRELL, N. R.; PEIRIS, J. S.; 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.

BEN SALEM, A. N.; CHUPIN, S. A.; BJADOVSKAYA, O. P.; ANDREEVA, O. G.; MAHJOUB, A.; PROKHVATILOVA, L. B. Multiplex nested RT-PCR for the detection of porcine enteric viruses. **Journal of Virological Methods,** v. 165, n. 2, p. 283-293, 2010.

BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, I. H.; RUCK, B. J**. Letter: Evidence for viral gastroenteritis,** v. 289, p. 1096–1097,1973.

BLECHA, F. Immunological aspects: comparison with other species. In: The lactating sow.Editors: VERSTEGEN, M. W. A.; MOUGHAN, P. J.; SCHRAMA, J. W. **Wageningen Pers,** Holanda, 1998, p 23-40.

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

BORCHARDT, M. A.; HAAS, N. L.; HUNT, R. J. Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70**,** p. 5937–5946, 2004.

BRANDAO, P. E.; CORTEZ, A.; FERREIRA, F.; FERREIRA NETO, J. S.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M. B.; HOMEM, V. S. F.; RODRIGUEZ, C. A. R.; JEREZ, J. A. Seroprevalence of antibodies against group A rotavirus in cattle from a pioneer frontier in Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** v. 39, p. 18-20, 2002.

BRIDGER, J. C.; WOODE, G. Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. **British Veterinary Journal**, v. 131, p. 528 – 535, p. 1975.

BUESA, J.; COLOMINA, J.; RAGA, J.; VILLANUEVA, A.; PRAT, J. Evaluation of reverse transcription and polymerase chain reaction (RT/PCR) for the detection of rotaviruses: applications of the assay. **Research in Virology,** v. 147, n. 6, p. 353-361, 1996.

BUZINARO, M. G.; FREITAS, P. P. S. Rotavírus do grupo A em rebanhos bovinos leiteiros da região Nordeste do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico,** v.69, n.4, p. 23-26, 2002.

CALDERARO, F. F.; BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, A. J.; PENA, H. J. F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactantes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico,** v. 68, p. 29-34, 2001.

COLLINS, P. J.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C.; O'SHEA, H. Identification of a G2-like porcine rotavirus bearing a novel VP4 type, P[32], **Veterinary Reearchs,** v. 41, p.73, 2010a.

COLLINS, P. J.; MARTELLA, V.; SLEATOR, R. D.; FANNING, S.; O'SHEA, H. Detection and characterisation of group A rotavirus in asymptomatic piglets in southern Ireland **Archives of Virology,** v. 155, p. 1247-1259, 2010b.

COSTANTINI, V. P. **Animal enteric viruses: gene expression, epidemiology and their role in shellfish and environmental contamination.** 2007. 415 F. Dissertation (Doctor of Philosophy Veterinary Preventive Medicine) - Ohio State University, Ohio, 2007.

COULSON, B. S. Typing of human rotavirus VP4 by an enzyme immunoassay using monoclonal antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, p.01-08, 1993

DENNEHY, P. H.; GAUNTLETT, D. R.; TENTRE, W. E. Comparison of nine commercial immunoassays for the detection of rotavirus in faecal specimens. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 26, p. 1630 -1634, 1988.

DE 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 in Veterinary Science,** v. 41, p. 270 -272, 1986.

DEWEY, C. E.; WITTUM, T. E.; HURD, H. S.; DARGATZ, D. A.; HILL, G. W. Herd and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 4-14 days of age. **Journal of Swine Health and Production**, v. 3, p. 21-28, 1995.

DEWEY, C.; CARMAN, S.; PASMA.; JOSEPHSON, G.; MCEWEN, B. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. **Canadian Veterinary Journal,** v. 44, p. 649-653, 2003.

DIMITROV. D. H.; GRAHAM, D. Y.; **LOPEZ,** J.; MUCHINIK, G.; VELASCO, G.; STENBACK, W. A; ESTES, M. K. RNA electropherotypes of human rotaviruses from North and South America. **Bulletin of the World Health Organizatio**n, v.62, p. 321-329, 1984.

DRIESEN, S. J.; CARLAND, P. G.; FAHY, V. A. Studies on preweaning piglet diarrhoea. **Australian Veterinary Journal,** v. 70, p. 259-262, 1993.

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

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 2001. p.1747-1786.

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

ESTES, M. K.; GRAHAM, D. Y.; DIMITROV, D. H. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. **Progress in Medical Virology,** v.29, p. 1-22, 1984.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, P. M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. 5 ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1917-73.

ESTES, M. K.; MORRIS, A. P. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus - induced pathogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology,** v. 473, p. 73-82, 1999.

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

GALLIMORE, C. I.; TAYLOR, C.; GENNERY, A. R.; GENNERY, R. A.; CANT, A. J.; GALLOWAY, A.; XERRY, J.; ADIGWE,J.; GRAY, J. J. Contamination of the Hospital Environment with Gastroenteric Viruses: Comparison of Two Pediatric Wards over a Winter Season. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 46, p. 3112-3115, 2008.

GASKINS, H. R.; KELLEY, K. W. **Immunology and neonatal mortality. In: M. A. VARLEY (ed.) The Neonatal Pig: Development and Survival.** pp 39–55. CAB International, Leeds, U.K. 1995.

GRASSI, T.; BAGORDO, F.; IDOLO, A.; LUGOLI, F.; GABUTTI, G.; DE DONNO, A. Rotavirus detection in environmental water samples by tangential flow ultrafiltration and RT-nested PCR. **Environmental Monitoring and Assessment,** v. 164, n. 1/4, p. 199-205, 2010.

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

GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; BRANDAO, P. E.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. Diversity of porcine rotavirus genotypes in Sao Paulo State, Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileir**a, v. 29, p. 707-712, 2009.

GATTI, M. S. 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. **Med. Microbiology Immunology,** v. 178, p. 347 -349, 1989.

GONÇALVES, R. G.; PALMEIRA, E. M. Suinocultura Brasileira. **Observatorio de La Economía Latino americana,** v. 71, 2006.

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. **Jouranl of Clinical Microbiology,** v. 28, p. 276-282, .

GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. Identification of Bovine and Porcine Rotavirus G Types by PCR. **Jouranl 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. 2, n. 5, p. 1333-1337, 1994b.

HE, X. Q.; CHENG L.; ZHANG, D. Y.; LI, W.; XIE, X. M.; MA, M.; WANG, Z. J. First Molecular Detection of Group A Rotaviruses in Drinking Water Sources in Beijing, China. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,** v. 83, p. 120-124, 2009.

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, p.473-477, 1982.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. Rotavirus Antigens. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 185, p. 179-227, 1994.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A.Z. Rotavirus serotypes: classification and importance in epidemiology, immunity, and vaccine development. **Journal of Health**, **Population and Nutrition**, Bangladesh**,** v. 18, n. 514, 2000.

HOSHINO, Y.; SERENO, M. M.; MIDTHUN, K., FLORES, J.; KAPIKIAN, A. Z.; CHANOCK, R. M. Independent segregation of two antigenic specificities (VP3 and VP7) involved in neutralization of rotavirus infectivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 82, p. 8701- 8704, 1985.

ICTV. INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. *Reoviridae* - 2009. Disponível em <http://ictvonline.org>. Acesso em: 13 jun. 2011.

ITURRIZA-GÓMARA, M.; ISHERWOOD, B.; DESSELBERGER, U.; GRAY, J*.* Reassortment in vivo: Driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999*.* **Journal of Virology,** v. 75, p. 3696 - 3705*.*

JEREZ J. A.; BRANDÃO P. E.; BUZINARO M. G.; GREGORI F.; ROSALES C. A. R.,; ITO F. H.; SAKAI T. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarréia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico,** v. 69(2), p. 19-23, 2002.

KALICA, A. R.; GARON, C. F.; WYATT, R. G.; MEBUS, C. A.; VAN KIRK, D. H.; CHANOCK, R. M.; KAPIKIAN, A. Z. Differentiation of human and calf reovirus –like agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrohoresis of RNA. **Virology,** v. 74, p. 86, 1978.

KANG, G.; KELKAR, S. D.; CHITAMBAR, S. D.; RAY, P.; NAIK, T. Epidemiological profile of rotaviral infection in India: challenges for the 21stcentury. **Journal of Infection Disease,** v. 192, p. 120-126, 2005.

KAPIKIAN, A. Z., CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, M.; CHANOCK, R. M.; HIRSCH, M. S.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P. ROIZMAN, B. (Ed.). **Virology.** 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, p. 1657 - 1708,1996.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY , P. M. (ed.). **Fields Virology,** 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. v. 2, p. 1787–1883.

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

LASO, M. J.; ROMAN, A.; HEAD, J.; CERVERA, I.; RODRIGUEZ, M.; RODRIGUEZ, A.; PICAZO, J. J. Phylogeny of G9 rotavirus genotype: a possible explanation of its origin and evolution. **Journal of Clinical Virololgy**, v. 44, p. 52–72, 2009.

LIGHT, J. S.; HODES, H. L. Studies on epidemic diarrhea of the new-born: Isolation of a Filtrable Agent Causing Diarrhea in Calves. **American Journal Public Health Nations Health,** v. 33, p. 1451–1454, 1943.

LINARES, R. C.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; FERRONATO, C.; GRIEDER, W.; ALFIERI, A. A. Frequency of group A rotavirus in piglet stool samples from non-vaccinated Brazilian pig herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology,** v. 52, p. 63-68, 2009.

LINHARES, A. C.; PINHEIRO, F. P.; SCHMETZ, C.; MÜLLER, G.; PETERS, D. Rotavírus em Belém do Pará, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina,** v. 19, p. 278, 1977.

LODDER, W. J.; RODA HUSMAN, A. M. Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in the Netherlands. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 71, p. 1453-1461, 2005.

LOURENÇO, M.H.; NICOLAS, J.C.; COHEN, J. Study of humam rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. **Annales de l'Institut Pasteur – Virologie,** v. 132, p.161-73, 1981.

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

McCRAE, M.A. **Nucleic acid-based analysis of non-group A rotaviruses**. In: Ciba Found Symp. Novel diarrhea Viruses. Chichesters, UK: Wiley;Sons, v.128, p.24-48, 1987.

MATSUNO, S.; HASEGAWA, A.; MUKOYAMA, A.; INOUYE, S. A candidate for a new serotype of human rotavirus. **Journal of Virology,** v.54, p. 623 – 624, 1985.

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 & Infectious Diseases,** v. 19, p. 219-232, 1996.

MARTELLA, V.; BANYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology,** v. 140, p. 246–255, 2010.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M. K.; GENTSCH, J. R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C. D.; MARTELLA V, MERTENS PP, NAKAGOMI O, PATTON JT, RUGGERI FM, SAIF LJ, SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology,** v. 153, p. 1621-1629, 2008.

MATTHIJNSSENS, J.; RAHMAN, M.; CIARLET, M.; ZELLER, M.; HEYLEN, E.; NAKAGOMI, T.; UCHIDA, R.; HASSAN, Z.; AZIM, T. Reassortment of human rotavirus gene segments into G11 rotavirus strains. **Emerging Infectious Disease,** v. 16, p. 625 - 630. 2010a.

MATTHIJNSSENS, J.; TARAPOREWALA, Z. F.; YANG, H., RAO, S.; YUAN, L., CAO, D.; HOSHINO, Y.; MERTENS, P. P.; CARNER, G. R. Simian rotaviruses

possess divergent gene constellations that originated from interspecies transmission and reassortment. **Journal of Virology,** v. 84, p. 2013 - 2026. 2010b.

MATTHEWS, R. E. F. Third report of the International Committee on Taxonomy of Viruses ; Classification and nomenclature of viruses. **Intervirology,** v. 12, 129–296, 1979.

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

MIAGOSTOVICH, M. P.; FERREIRA, F. F.; GUIMARÃES, F. R.; FUMIAN, T. M.; DINIZ-MENDES, L.; LUZ, S. L.; SILVA, L. A.; LEITE, J. P. Molecular detection and characterization of gastroenteritis viruses occurring naturally in the stream waters of Manaus, central Amazonia, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 74, p. 375-382, 2008.

MIYAZAKI, A.; KUGA, K.; SUZUKI, T.; KOHMOTO, M.; KATSUDA, K.; TSUNEMITSU, H. Genetic diversity of group A rotaviruses associated with repeated outbreaks of diarrhea in a farrow-tofinish farm: identification of a porcine rotavirus strain bearing a novel VP7 genotype, G26. **Veterinary Research,** v. 42, p. 112 – 120, 2011.

MOE, K.; SHIRLEY, J. K. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. **Archives of Virology,** v. 72, p. 179-186, 1982.

MOON, H. W. Comparative histopathology of intestinal infections. **Advances in Experimental Medicine and Biology,** v. 412, p. 01-19, 1997.

MOREJON, C. F. M.; ROCHA JR, W. F.; PIACENTI, C. A.; FARIA, S.; PALU, F.; TRIGUEIROS, D. E. G. **Desenvolvimento regional por meio da agregação de valor à resíduos sólidos, líquidos e gasosos provenientes das mais diversas fontes.** In: III COLÓQUIO ANUAL DE ENGENHARIA QUÍMICA 2003, 2003, Rio de Janeiro. A Engenharia Química do Século XXI. Rio de Janeiro: COPPE/UFRJ, 2003.

MORES, N.; SOBESTIANSKY, J.; CIACCI, J. R.; AMARAL, A. L. do; BARIONI JUNIOR, W. **Fatores de risco na maternidade associados a diarréia, mortalidade e baixo desempenho dos leitões**. Concórdia: EMBRAPA - CNPSA, 1991. 4 p. (EMBRAPA - CNPSA. Comunicado Técnico, 178).

MORES, N.; SOBESTIANSKY, J.; VIEIRA, R.; Estudo ecopatológico sobre problemas e leitões lactentes em criações no sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 47, n. 4, p. 549- 559, 1995.

MORES, N.; AMARAL, A. L. do; BARION, I.; JUNIOR, W. Fatores de risco associados aos problemas da fêmea suína no puerpério. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINARIOS ESPECIALISTAS EM SUINOS, 9., 1999, Belo Horizonte,MG. **Anais...** Concórdia : EMBRAPA-CNPSA, 1999. p.385-386.

NISHIDA, M. K. ; RUIZ, V. L. A.; GREGORI, F. Detecção de rotavírus em efluentes de criações de suínos no Estado de São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária,** v. 25, p. 136-141, 2009.

PEDLEY, S.; BRIDGER, J. C.; BROWN, J. F.; McCRAE, M. A. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. **Journal of General Virology**, v. 64, p. 2093-2101, 1983.

PRASAD, B. V. V.; CHIU, W. Structure of rotavirus. **Current Topics in Microbiology and Immunology,** v.185, p.09-29, 1994.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; ANDRADE, Z. P.; CASTRO, L. A. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. **Journal of Virological Methods,** v. 10, n. 1, p. 21-28, 1985.

PONGSUWNNE, Y.; TDGUCHI, K.; CHOONTHANOM, M.; CHIWAKUI, M.; SUSANSOOK, T.; SAGAANWONGSE, S.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S.; Subgroup and sertotype distributions of human, bovine and porcine rotavirus in Thailand. **J. Qin. Miaobiol,** v. 27, p. 1956-1960, 1989.

RÁCZ, M. L.; KROEFF, S. S.; MUNFORD, V.; CARUZO, T. A. R.; DURIGON, E.; HAYASHI, Y.; GOUVEA, V.; PALOMBO, E. A. Molecular characterization of porcine rotavirus from the Southern region of Brazil: characterization of atypical genotype G9 strain. **Journal of Clinical Microbiology,** v.38, p.2443-2446, 2000.

RAMIN, R. F. Genetics of the rotaviruses. **Annual Review of Microbiology,** v. 51, p. 225-255, 1997.

RAMOS, A. P. D.; STEFANELLI, C. C.; LINHARES, R. E. C.; BRITO, B. G.; SANTOS, V.; GOUVEA, V.; LIMA, R. C.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology,** v. 1-2, n. 71, p. 1-8, Jan., 2000.

ROEHE, P.M.Ocorrência de rotavirus em granjas de suínos no Rio Grande do Sul. CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, II, 1985, Rio de Janeiro. **Anais.** Rio de Janeiro: Comissão científica do II congresso brasileiro dos veterinários especialistas em suínos, p. 123, 1985.

ROEHE, P. M.; CUNHA, A. C.; SALVO, E. O.; MARTINS, R. M.; ROSA, J. C.; OLIVEIRA, L.; HOFFMANN, V. L. Rotavírus em suínos na Região Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 9, p. 45-49, 1989.

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

RODGER, S. M.; BISHOP, R.; BIRCH, C.; McLEAN, B.; HOLMES, I. H. Molecular epidemiology of humam rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as

determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. **Jouranl of Clinical Microbiology,** v.13, p. 272 - 278,1981.

RUSTEMPASIC, S. M.; BÁNYAI, K.; ESONA, M, D.; FOYTICH, K.; BOWEN M. D.; GENTSCH, J. R. Genome sequence based molecular epidemiology of unusual US rotavirus A G9 strains isolated from Omaha, USA between 1997 and 2000. **Infection, Genetics and Evolution,** v. 11, p. 522–527, 2011.

SAIF, L. J.; FERNANDEZ, F. M. Group A rotavirus veterinary vaccines. **Journal of Infection Disease,** v. 174, p. 98-106, 1996.

STEYER, A.; POLJSAK-PRIJATELJ, M.; BARLIC-MAGANJA, D; MARIN. J. Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: Evidence of interspecies transmission and genome reassortment. **Jounal of General Virololgy,** v. 89, p. 1690-1698, 2008.

SOBESTIANSKY, J. **Sistema intensivo de produção de suínos: programa de biossegurança.** Goiânia; Gráfica art3, 2002., 107 p.

SONG, D. S.; KANG, B. K.; OH, J. S.; HA, G. V.; YANG, J. S.; MOON, H. J.; JANG, Y. S.; PARK, B. K. Multiplex reverse transcription-PCR for rapid differential detection of porcine epidemic diarrhea virus, transmissible gastroenteritis virus, and porcine group A rotavirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation,** v. 18, p. 278-281, 2006.

TANIGUCHI K.; URASAWA S. Diversity in rotavirus genomes. **Seminars in Virology,** v. 6, p. 123-131, 1995.

TODD, D.; MCNULTY, M.S. Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gels. **Avian Pathology Journal,** v.15, p.149-159, 1986.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Academic Press,** New York, NY. 2000.

VERHEYEN, J.; TIMMEN-WEGO, M; LAUDIEN, R.; BOUSSAAD, I.; SEN, S.; KOC, A.; UESBECK, A.; MAZOU, F.; PFISTER, H. Detection of Adenoviruses and Rotaviruses in Drinking Water Sources Used In Rural Areas of Benin, West Africa. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 75, p. 2798-2801, 2009.

WESTROM, B. R.; OHLSSON, B. G.; SVENDSEN, J; TAGESSON, C.; KARLSSON, B. W. Intestinal transmission of macromolecules (BSA and FITCdextran) in the neonatal pig: enhancing effect of colostrum, proteins and proteinase inhibitors. **Biology of the Neonate,** v.47, p.349-366, 1985.

WIELER, L. H.; LLIEFF, A.; HERBEST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLOS, 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, Infectious Diseases and Veterinary Public Health,** v. 48, p. 151-159, 2001.

WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z. Comparison of Polymerase Chain Reaction and Dot Hybridization with Enzyme-Linked Immunoassay, Virological Examination and Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Detection of Porcine Rotavirus in Faecal Specimens. **Journal of Veterinary Medicine, Series B,** v. 46, n. 9, p. 623-34, 2002.

WINTER, R.; BRAUN, M. B. S.; LIMA J. F. Notas sobre o impacto da produção de suínos na bacia do Rio Toledo – Paraná. **Revista Informe GEPEC**, UNIOESTE, Ribeirão Preto-SP,v. 2, 2005.

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

ZIEMER, C.J.; BONNER, J. M.; COLE, D.; VINJÉ, J.; CONSTANTINI, V.; GOYAL, M.; GRAMER, R.; MACKIE, X. J.; MENG, G.; MEYERS, G.; SAIF, L. J. Fate and transport of zoonotic, bacterial, viral, and parasitic pathogen during swine manure treatment,storage, and land application. **Journal of Animal Science,** v. 88, p. 84-94, 2010.

ANEXO

ANEXO A

SOLUÇÕES EMPREGADAS NA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO DO GEL

1 SOLUÇÕES PARA EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

1.1 Tampão TRIS/HCL 0,1M; pH 7,3; para o preparo das fezes

Reagentes	Quantidades
TRIS (base)	12,114 g
CaCl2	0,1662 g
Águabi destilada	q.s.p. 1000 mL
HCl concentrado	q.s.p. para pH 7,3

1.2 SDS 10%

Reagentes	Quantidades
Lauril sulfato de sódio	10,0 g
Águabi destilada	q.s.p. 100 mL

1.3 Dissociador da amostra

Reagentes	Quantidades
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

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

2 SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

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

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

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

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

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

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

2.4 Persulfato de amônio (20 mg/mL)

Reagentes	Quantidades
Persulfato de amônio	20 mg
Água bidestilada	q.s.p. 1,0 mL

2.5 Gel de poliacrilamida*

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

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

3 SOLUÇÕES PARA O PREPARO DO TAMPÃO DE CORRIDA

3.1 Solução estoque TRIS-glicina 4x

Reagentes	Quantidades
TRIS (base)	12,0 g
Glicina	57,6 g
Azida sódica 10%	10,0 mL
Águabi destilada	q.s.p. 1000 mL

3.2 Tampão de corrida

Reagentes	Quantidades
TRIS-glicina 4x	60 mL
Águabi destilada	180 mL

4 REVELAÇÃO DO GEL POR NITRATO DE PRATA

4.1 Etanol-ácido acético

Reagentes	Quantidades
Etanol	10 mL
Ácido acético	0,5 mL
Águabi destilada	q.s.p. 100 mL

4.2 Nitrato de Prata 0,011M

Reagentes	Quantidades
Nitrato de prata	0,185 g
Águabi destilada	q.s.p. 100 mL

4.3 Solução reveladora

Reagentes	Quantidades
NaOH	3,75 g
Formaldeído (40%)	0,95 mL
Águabi destilada	q.s.p. 125 mL

Observação: adicionar o formaldeído quando o volume estiver próximo do volume total.

4.4 Ácido acético 5%

Reagentes	Quantidades
Ácido acético	5 mL
Águabi destilada	q.s.p. 100 mL

4.5 Etanol 10%

Reagentes	Quantidades
Etanol	10 mL
Águabi destilada	q.s.p. 100 mL

4.6 Fixador

Reagentes	Quantidades
Metanol	65 mL
Glicerol	5 mL
Águabi destilada	q.s.p. 100 mL