



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**YARA CAVALCANTE VIEIRA**

**ROTAVIROSE ANIMAL**

Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Perecmanis.

Brasília - DF  
2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

YARA CAVALCANTE VIEIRA

ROTAVIROSE ANIMAL

Monografia apresentada para a conclusão  
do Curso de Medicina Veterinária da  
Faculdade de Agronomia e Medicina  
Veterinária da Universidade de Brasília.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Perecmanis.

Brasília - DF  
2015



Vieira, Yara Cavalcante.

Rotavirose Animal / Yara Cavalcante Vieira; orientação de Simone Perecmanis – Brasília, 2015.

51p.

Monografia – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. Rotavírus 2. Gastroenterite 3. Diarreia.

I. Perecmanis, Simone. II. Rotavirose Animal.

### **Cessão de direitos**

Nome do Autor: Yara Cavalcante Vieira

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Rotavirose Animal.

Ano: 2015.

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.

---

Yara Cavalcante Vieira

Endereço eletrônico: [ycavalcantevieira@gmail.com](mailto:ycavalcantevieira@gmail.com)



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: Yara Cavalcante Vieira.

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Rotavirose Animal.

Monografia de conclusão do Curso de Medicina Veterinária apresentada à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.

Aprovado em: 08/07/2015.

Banca Examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Perecmanis

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Gino Chaves da Rocha

Instituição: Universidade de Brasília

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

M.V. Laurício Monteiro Cruz

Instituição: Secretaria de Estado de Saúde do DF

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



## AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente meus pais que acreditaram no meu potencial, me apoiaram e incentivaram da forma que podiam durante toda essa jornada que não foi fácil.

Ao Caio, meu melhor amigo, namorado e companheiro de tantos anos. Obrigada pelo incentivo e ajuda, te amo.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Perecmanis, por me receber em seu laboratório ainda no início da graduação. Agradeço-a por todos os conselhos, preocupações e pelo exemplo de profissionalismo a ser seguido.

A todos os professores do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da UnB pela formação acadêmica científica.

A toda a equipe do LVCA-FIOCRUZ por me receberem tão carinhosamente e me ajudarem durante a realização do estágio supervisionado, especialmente ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite e Dr. Túlio Fumian por toda a confiança depositada e disposição em ajudar durante este período. Também agradeço aos “PIBICS” Christian, Tamiris, Tatiana e Matheus, pelas descontrações, trabalho duro e a companhia durante os almoços.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Veterinária da UnB pelos anos de convivência, companheirismo e ajuda em todas as iniciações científicas durante a graduação. Especialmente: Ana Paula, Vinícius e Hudson que sempre estiveram dispostos a ajudar com todos os experimentos dos pibics, e ao Fernando por sempre estar disponível para retirar minhas amostras do termociclador quando eu precisava sair do laboratório.

À minha amiga Bárbara, a melhor companheira que eu poderia desejar durante a graduação, por todos os resumos compartilhados, horas de insônia pré-prova e a amizade que com certeza ficará para o resto da vida.

A todos os amigos e colegas que conheci durante o curso de medicina veterinária, tanto da UnB como dos cursos de férias que realizei por esse vasto Brasil.

Aos amigos que estiveram presentes em diversos momentos dessa jornada. Em especial Agatha Botelho com quem pude viver diversas aventuras pelo mundo e Sandro Caldas companheiro de perrengues durante o curso.

A todos os animais que tive durante a vida, com certeza são os animais que nos convencem e impulsionam a escolher a medicina veterinária como profissão, especialmente: Floyd (*in memorian*), Suzane (*in memorian*), Dolly (*in memorian*), Billy (*in memorian*), Bagulho (*in memorian*), Snowbell e George.

A todos que participaram direta ou indiretamente desta etapa, meu muito obrigada.



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

*“I don't know where I'm going from here,  
but I promise it won't be boring.”*

- David Bowie.



VIEIRA, Y. C. Rotavirose Animal. 2015. P.51. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

## **RESUMO**

Os rotavírus são identificados em todo o mundo como um dos principais responsáveis por gastroenterites agudas em crianças e animais jovens de diversas espécies. Estes vírus são constituídos por partículas icosaédricas, não envelopadas, formadas por um genoma de 11 segmentos de RNA fita-dupla e que codifica 12 proteínas. Os rotavírus podem ser classificados em sete sorogrupos designados de A-G, sendo o sorogrupo A, o principal responsável pelo quadro diarreico observado na infecção viral em humanos e animais. Os sinais clínicos da rotavirose incluem diarreia pastosa à líquida, vômito e ocasionalmente febre. Cepas de rotavírus animal podem aumentar a variabilidade genética e a patogenicidade das cepas humanas circulantes, causando problemas à saúde pública e principalmente à eficácia das vacinas humanas disponíveis. O objetivo deste trabalho é a produção de uma revisão de literatura acerca da infecção por rotavírus em animais, principalmente os animais destinados para a produção de alimentos e insumos para consumo humano, nos quais a rotavirose acarreta alto prejuízo econômico.

Palavras-chave: Rotavírus; Gastroenterite; Diarreia.



VIEIRA, Y. C. Rotavirose Animal. 2015. P.51. Monografia (Conclusão do Curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

## **ABSTRACT**

The rotaviruses are identified worldwide as responsible for acute gastroenteritis in children and young animals of many species. These viruses consist of icosahedral particles, not enveloped, formed by a RNA genome with 11 double-stranded segments that encode 12 proteins. Rotaviruses can be classified into seven serogroups designated A to G. The serogroup A is the primarily responsible for diarrheal syndrome noticed in the viral infection in humans and animals. Symptoms of rotavirus disease include pasty and watery diarrhea, vomiting and sometimes fever. Animal rotavirus strains can also increase genetic variability and pathogenicity of circulating human strains, causing problems to public health and especially in the effectiveness of available human vaccines. The goal of this study is to produce an overview about rotavirus infection in animals, mainly those animals intended for food and inputs production for human consumption, in which the rotavirus disease causes high economic losses.

Keywords: Rotavirus; Gastroenteritis; Diarrhea.



## LISTA DE FIGURAS

### PARTE I

- Figura 1.** Partícula viral completa (A); partícula com dupla camada (B); partícula de camada simples (C). 14
- Figura 2.** À esquerda, eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) evidenciando os 11 segmentos genômicos dos rotavírus; ao centro, as respectivas proteínas codificadas por cada segmento; à direita, ilustração da estrutura de uma partícula viral completa com capsídeos interno, intermediário e externo. 15
- Figura 3.** Esquema da replicação dos rotavírus. ER - Retículo Endoplasmático; Ca<sup>2+</sup> - íon cálcio; LC3 - Marcador autofagossomal. 20
- Figura 4.** Mecanismos envolvidos na patogênese da diarreia causada por rotavírus. 22
- Figura 5.** Esquematização do teste imunoenzimático ELISA direto, com adição apenas de anticorpos primários. 25
- Figura 6.** Imagem obtida através da microscopia eletrônica do Rotavírus. 26
- Figura 7.** Padrões de migração encontrados nos eletroferotipos do genoma viral dos rotavírus. 27
- Figura 8.** Esquema demonstrativo da técnica de imunofluorescência; A – técnica de imunofluorescência direta com adição de apenas um anticorpo já conjugado com enzima; (B) – técnica de imunofluorescência indireta com anticorpo secundário ligado a anticorpo primário. 28



## LISTA DE QUADROS

### PARTE II

**Quadro 1.** Métodos executados durante o período de estágio com distribuição temporal e número total de amostras. 42



## LISTA DE TABELAS

### PARTE I

- Tabela 1.** Seguimentos genômicos dos rotavírus e suas respectivas proteínas codificadas, sua localização na partícula viral e função já esclarecida. 16
- Tabela 2.** Proteínas codificadas pelos 11 segmentos virais, quantidade de genótipos já descritos de rotavírus do sorogrupo A, de acordo com cada proteína e suas respectivas funções. 18



## SUMÁRIO

### PARTE I - ROTAVIROSE ANIMAL

1. INTRODUÇÃO	12
2. HISTÓRICO E GENERALIDADES DO AGENTE ETIOLÓGICO	14
3. CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL	19
4. PATOGÊNESE E SINAIS CLÍNICOS DA INFECÇÃO VIRAL	21
5. MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS ROTAVÍRUS	24
6. TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA	31
7. EPIDEMIOLOGIA DA ROTAVIROSE ANIMAL	34
8. ASPECTOS ZONÓTICOS DOS ROTAVÍRUS	36
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	38

### PARTE II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

1. INTRODUÇÃO	39
2. LABORATÓRIO DE VIROLOGIA COMPARADA E AMBIENTAL – FIOCRUZ	40
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>44</b>



## PARTE I

### ROTAVIROSE ANIMAL

#### 1. INTRODUÇÃO

Animais neonatos de diversas espécies são frequentemente acometidos por doenças causadoras de gastroenterite e os sintomas decorrentes da doença, principalmente a diarreia, causam um importante problema sanitário que gera prejuízos econômicos consideráveis para a produção animal. As diarreias neonatais acometem animais de países desenvolvidos e em desenvolvimento e possui distribuição cosmopolita, ocorrendo, tanto em propriedades de pequenos produtores, quanto em grandes propriedades tecnificadas (HOLLAND, 1990; KANEENE *et al.*, 1990).

As gastroenterites infecciosas podem ser desencadeadas por diversos agentes patogênicos causando alterações nas funções estomacais e intestinais com sinais clínicos de vômito, diarreia e ocasionalmente febre (LIMA & DIAS, 2010). Pode-se definir diarreia como a presença de excesso de água nas fezes com diminuição da consistência do bolo fecal. A diarreia pode ainda, ser classificada como secretória, mal absorvível e efusiva (VANUCCI & GUEDES, 2009). As diarreias possuem etiologia complexa onde estão envolvidos diversos fatores, dentre eles ambientais, nutricionais e infecciosos como as bactérias, as toxinas bacterianas, os vírus e os parasitos (ZLOTOWSKI *et al.*, 2008). Em animais jovens as diarreias acarretam alterações marcantes nas taxas de conversão alimentar, desidratação, desequilíbrio de eletrólitos e acidose metabólica, predispondo os animais imunossuprimidos às infecções oportunistas (STIPP, 2011).

Com relação às diarreias de etiologia viral, os rotavírus são considerados um dos principais agentes causadores de gastroenterite, tanto em humanos, como em animais. O vírus encontra-se amplamente difundido na natureza e possui uma ampla variedade de hospedeiros susceptíveis, como os mamíferos e as aves. Em animais jovens, as infecções por rotavírus causam grande impacto econômico no setor produtivo e, apesar de frequentemente não apresentarem sintomatologia, os animais adultos podem atuar como fontes de infecção do agente viral para os animais jovens da mesma espécie ajudando a disseminar o vírus em um rebanho (BERN & GLASS, 1994; ALFIERI *et al.*, 2007; STIPP, 2011).

Acredita-se que atualmente os rotavírus estejam amplamente disseminados em rebanhos de



bovinos, suínos, equinos e de frangos de corte nacionais. Em suínos e bovinos é o principal agente envolvido na doença conhecida como diarreia neonatal bovina e suína, que possui caráter multifatorial e multietiológico, sendo esta a infecção mais frequente entre a segunda e terceira semana de vida destes animais (ALFIERI *et al.*, 2007). Em leitões esta fase abrange os períodos de creche e de maternidade quando estes animais enfrentam os maiores desafios à sanidade entérica (MÉDICI, 2007). Os bovinos apresentam maior susceptibilidade entre a primeira e segunda semana de vida devido a dependência de transferência passiva de anticorpos maternos neste período (FREITAS *et al.*, 2011).

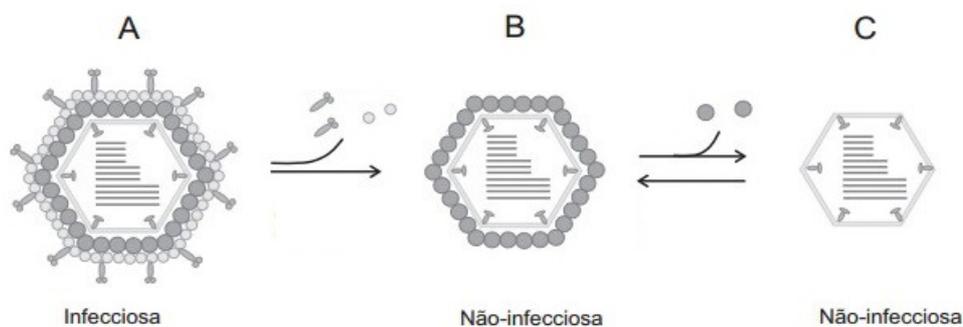
Os rotavírus desempenham importante papel no curso das gastroenterites podendo constituir zoonose de potencial significância para a saúde pública. Evidências da transmissão zoonótica e da reestruturação de genes virais de cepas de rotavírus humano e animal encontram-se descritas em diversos estudos, nos quais a frequente identificação de cepas incomuns de rotavírus em humanos sugerem a ocorrência das reestruturações gênicas entre cepas de diferentes espécies durante co-infecções. Acredita-se que várias rotas de transmissão possam estar envolvidas na propagação de cepas relacionadas à animais para os seres humanos, as quais incluem o contato direto com animais de estimação, como cães e gatos, animais de produção e seus excretas que podem contaminar a água, alimentos e superfícies (COOK *et al.*, 2004).

Esse trabalho de conclusão de curso teve como objetivo a produção de uma revisão de literatura acerca da infecção por rotavírus em animais, principalmente os animais destinados para a produção de alimentos e insumos para consumo humano, nos quais a rotavirose acarreta alto prejuízo econômico.

## 2. HISTÓRICO E GENERALIDADES DO AGENTE ETIOLÓGICO

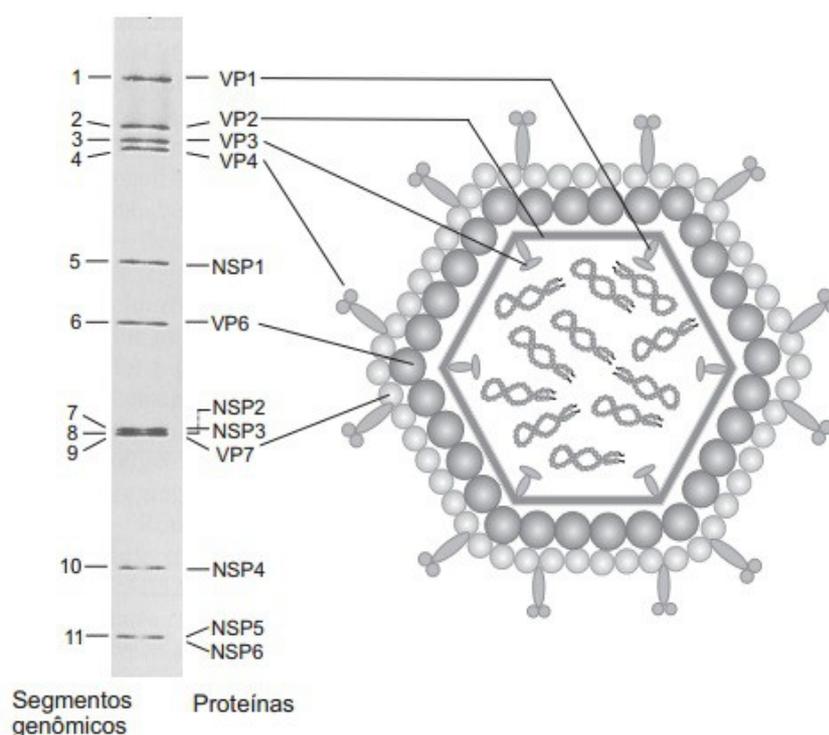
Em 1963, partículas virais até então desconhecidas foram identificadas como responsáveis por quadros de gastroenterite aguda em camundongos e macacos (ADAMS *et al.*, 1963; MALHERBE *et al.*, 1963 *apud* DESSELBERGER, 2014). Em 1969 MEBUS *et al.* (1969) utilizaram o material fecal de bezerros diarreicos para inoculação experimental em outros animais afim de reproduzir o quadro de diarreia observado anteriormente. As partículas virais visualizadas nas fezes desses animais em microscopia eletrônica foram denominadas NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus). Somente em 1973, partículas virais semelhantes às encontradas anteriormente em animais com diarreia foram observadas nas fezes de crianças com gastroenterite nos Estados Unidos e Reino Unido (BISHOP *et al.*, 1973; FLEWETT *et al.*, 1973). No ano seguinte, FLEWETT *et al.* (1974) propuseram o agrupamento de tais partículas virais sendo reconhecidas posteriormente pelo “Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus”, em 1978, com a criação do gênero *Rotavirus* dentro da família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae* (FLEWETT & WOODE, 1978).

A partícula viral infecciosa ou vírion do rotavírus apresenta aproximadamente 100 nm de diâmetro e simetria icosaédrica, não possui envelope e é constituída por três camadas proteicas concêntricas (capsídeo interno, intermediário e externo), e assemelha-se a uma roda quando observada em microscopia eletrônica. O capsídeo externo é essencial para a adsorção e penetração do vírus na célula, sendo que a partícula viral necessita estar completa para promover a infecção. A partícula viral sem o capsídeo externo ou ambos capsídeos externo e intermediário, são denominadas respectivamente partícula com dupla camada e partícula de camada simples (Figura 1) (GREENBERG & ESTES, 2009; SILVA, 2014).



**Figura 1.** Partícula viral completa (A); partícula com dupla camada (B); partícula de camada simples (C). Adaptado de ALFIERI *et al.*, 2007.

O genoma dos rotavírus é constituído por 11 segmentos de RNA fita-dupla, cada segmento codifica ao menos uma proteína viral e, ao todo são codificadas seis proteínas estruturais (VP1-4 – VP6-7) e cinco ou seis proteínas não-estruturais (NSP1 – NSP6). O segmento 11 possui duas *open reading frame* (ORF), cada uma codificando uma proteína não-estrutural, NSP5 e NSP6. Em algumas variantes de rotavírus do sorogrupo A o segmento 11 codifica apenas a proteína NSP5 ou ambas as proteínas, porém NSP6 com baixo nível de expressão (SILVA, 2014). As proteínas estruturais VP4 e VP7 localizam-se no capsídeo externo. A proteína VP6 é a proteína encontrada com maior abundância na partícula viral e encontra-se no capsídeo intermediário, chegando a representar cerca de 51% do vírus. No capsídeo interno ou *core* viral estão as proteínas VP1, VP2 e VP3 (Figura 2) (GREENBERG & ESTES, 2009).



**Figura 2.** À esquerda, eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) evidenciando os 11 segmentos genômicos dos rotavírus; ao centro, as respectivas proteínas codificadas por cada segmento; à direita, ilustração da estrutura de uma partícula viral completa com capsídeos interno, intermediário e externo (ALFIERI *et al.*, 2007).

As proteínas estruturais (VP) e não-estruturais (NSP) desempenham importante papel para a infecção viral e estão envolvidas em importantes fases da replicação do agente, na interação vírus – célula e no aumento da infectividade viral, dentre outros (tabela 1). Contudo, a função exata de

algumas proteínas ainda não está totalmente estabelecida.

Gene	Proteína	Massa (Da)	Localização nas partículas	Número de cópias	Funções
1	VP1	125.005	Nucleocapsídeo	12	RNA polimerase RNA-dependente.
2	VP2	102.431	Nucleocapsídeo	120	União ao RNA; forma o nucleocapsídeo.
3	VP3	98.120	Nucleocapsídeo	12	Guanililtransferase; metiltransferase; proteína básica.
4	VP4	86.782	Capsídeo	120	Proteína de união à célula; interage com VP6; antígeno neutralizante P-tipo. Infectividade aumenta após clivagem pela tripsina, formando as proteínas Vp5 e VP8.
		60.000	Produto da clivagem de VP4		
		28.000	Produto da clivagem de VP4		
5	NSP1	58.654	Proteína não-estrutural	0	Associa-se ao citoesqueleto; interage com fator 3 regulatório de IFN.
6	VP6	48.16	Capsídeo	780	Proteína estrutural do capsídeo intermediário; antígeno de subgrupo.
7	NSP3	34.600	Proteína não-estrutural	0	Envolvida na regulação da tradução.
8	NSP2	34.700	Proteína não-estrutural	0	Acumula-se em viroplasmias; atividade NTPase; liga-se à NSP5 e Vp1.
9	VP7	7.368	Capsídeo externo	780	Glicoproteína estrutural do capsídeo externo; antígeno neutralizante G-tipo.
10	NSP4	20.290	Proteína não-estrutural	0	Enterotoxina; receptor para partículas.
11	NSP5	21.725	Proteína não-estrutural	0	Possível cinase autocalítica; interage com VP2, NSP2 e NSP6.
	NSP6	11.012	Proteína não-estrutural	0	Produto do ORF2 do gene 11; interage com NSP5; localizada em viroplasmias.

**Tabela 1.** Seguimentos genômicos dos rotavírus e suas respectivas proteínas codificadas, sua localização na partícula viral e função já esclarecida (ALFIERI *et al.*, 2007).

Os rotavírus apresentam vários artifícios evolutivos distintos a fim de amplificar sua diversidade genética, como as mutações pontuais, os rearranjos, as reestruturações (*reassortments*), e as recombinações gênicas (ITURRIZA-GÓMARA, 2001). As mutações pontuais ocorrem de maneira frequente em vírus cujo genoma é o RNA, como os rotavírus possuem RNA polimerase RNA dependente não há mecanismos de reparação durante a replicação do genoma viral, ocasionando mutações pontuais em pares de nucleotídeos (GOUVEA & BRANTLY, 1995). Os rearranjos genéticos são o resultado de erros ocorridos durante a transcrição de um segmento do genoma viral, como resultado observam-se alterações no perfil de migração dos segmentos na eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE), porque estes erros ocasionam deleção ou, mais



frequentemente, a duplicação de segmentos (DESSELBERGER, 1996). As reestruturações ou *reassortments* ocorrem durante infecções mistas, onde pode ocorrer troca entre os segmentos de ambas as cepas que se encontram infectando uma mesma célula, podendo ser elas cepas humanas ou animais (MATSUNO *et al.*, 1980). Desta forma, devido às reestruturações é usual a detecção em fezes humanas de cepas incomuns e cepas geneticamente mais relacionadas a infecções em animais. As recombinações gênicas são importantes para a evolução dos vírus, porém no caso dos rotavírus há poucos estudos que documentam a ocorrência desse tipo de mecanismo evolutivo (PHAN *et al.*, 2007).

Os rotavírus podem ser classificados em sete sorogrupos distintos a partir das diferenças antigênicas encontradas na proteína VP6. Em animais, já foram detectados os sorogrupos A, B, C, D, E, F e G, contudo somente os sorogrupos A, B e C possuem importância clínica e epidemiológica para humanos e animais, pois são os únicos capazes de produzir a infecção, os demais sorogrupos D, E, F e G somente foram detectados em animais. O sorogrupo A é apontado como o principal responsável pelos episódios de gastroenterites e infecções subclínicas em animais e humanos. Esse sorogrupo possui ainda uma classificação própria em subgrupos de acordo com a ausência ou presença de epítomos imunorreativos à anticorpos monoclonais pré-determinados. Os sorogrupos B e C aparecem com menor frequência, mas podem desencadear a infecção em humanos e animais, sendo o sorogrupo C isolado principalmente em suínos (ALFIERI *et al.*, 2007).

Além da classificação em sorogrupos baseada na proteína VP6, os rotavírus também podem ser classificados em sorotipos e genótipos a partir das proteínas do capsídeo externo, VP4 e VP7, ou dos segmentos genômicos que as codificam, segmentos 4 e 9. Nesse tipo de classificação há um sistema binário, onde a proteína VP4 corresponde ao P tipo (sensível à protease) e a proteína VP7 corresponde ao G tipo (glicoproteína). Já foram descritos cerca de 27 genótipos G e 35 genótipos P até o presente momento, os quais podem dar origem a diversas combinações, sendo algumas mais usuais (HOSHINO & KAPIKIAN, 1996; ALFIERI *et al.*, 2007; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2011).

Existe atualmente uma classificação dos rotavírus do sorogrupo A, de acordo com seus 11 segmentos genômicos. Esta classificação serve para um melhor entendimento da função de cada gene viral e a compreensão da evolução inter espécies dos rotavírus. De acordo com esta classificação já foram descritos 27 **G** genótipos, 37 **P** genótipos, 17 **I** genótipos, 9 **R** genótipos, 9 **C** genótipos, 8 **M** genótipos, 16 **A** genótipos, 10 **N** genótipos, 12 **T** genótipos, 15 **E** genótipos e 11 **H**



genótipos, sendo designado o nome de cada genótipo de acordo com a função exercida por cada proteína estrutural e não-estrutural codificadas pelos genes virais (tabela 2) (SOARES, 2011).

<b>Proteínas</b>	<b>Genótipos descritos</b>	<b>Designação do nome dos genótipos de acordo com a função</b>
VP7	27G	Glicoproteína
VP4	37P	Protease
VP6	18I	Capsídeo Intermediário
VP1	9R	RNA polimerase RNA dependente
VP2	9C	Core ou núcleo viral
VP3	8M	Metiltransferase
NSP1	19A	Antagonista de Interferon
NSP2	10N	NTPase
NSP3	12T	Intensificador da tradução
NSP4	15E	Enterotoxina
NSP5 e NSP6	11H	Fosfoproteína (phosphoprotein)

**Tabela 2.** Proteínas codificadas pelos 11 segmentos virais, quantidade de genótipos já descritos de rotavírus do sorogrupo A de acordo com cada proteína e suas respectivas funções. Adaptado de DESSELBERGER, 2014.



### 3. CICLO DE REPLICAÇÃO VIRAL

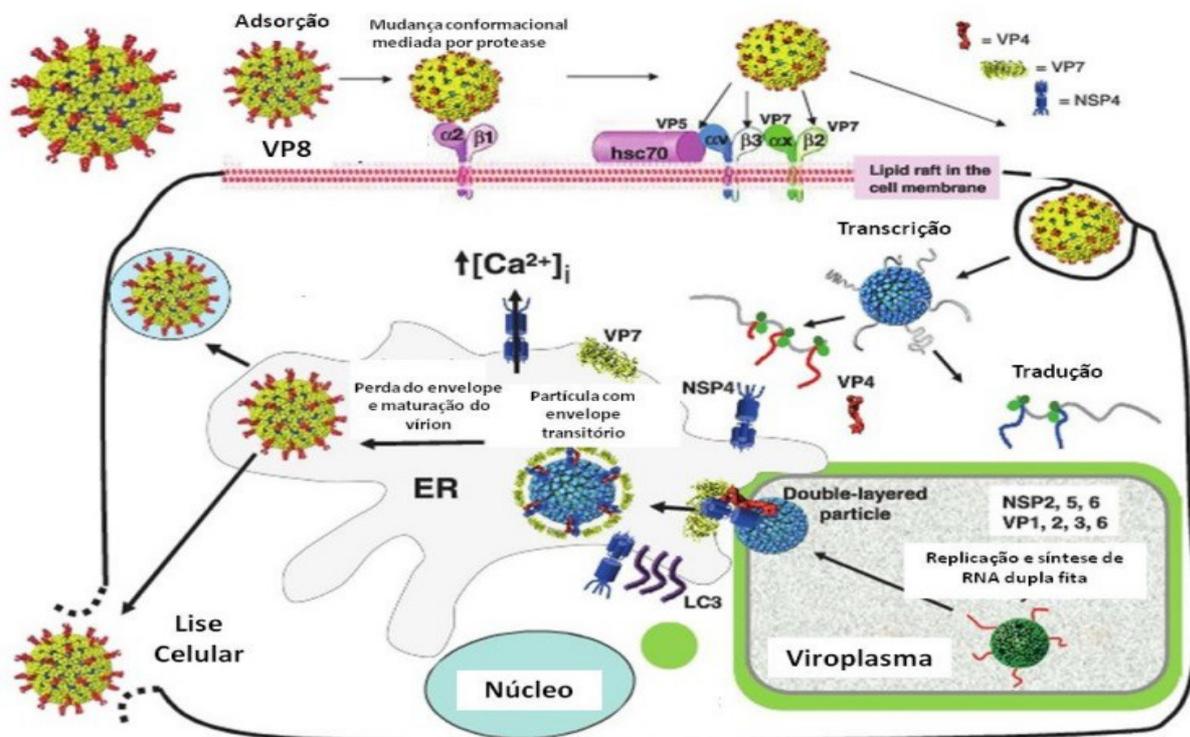
A replicação dos rotavírus ocorre no intestino delgado mais especificamente nos enterócitos maduros das vilosidades, os quais as partículas virais possuem maior afinidade química. No entanto, alguns estudos têm demonstrado a predileção de determinados sorogrupos por regiões intestinais específicas. Os rotavírus do sorogrupo A possuem predileção por células do duodeno e pela mucosa do jejuno, enquanto o sorogrupo D possui predileção por células do jejuno e do íleo de aves (HAYNES *et al.*, 1994; LUNDGREEN & SVENSSON, 2001). Somente a partícula viral completa, ou seja, com o triplo capsídeo consegue aderir-se às células e desencadear o ciclo replicativo (MÉDICE, 2007; SOARES, 2011).

Durante o processo de adesão e penetração do virion à célula as proteínas do capsídeo externo, VP4 e VP7 parecem exercer função essencial, porém todos os mecanismos envolvidos na penetração do vírus à célula ainda são desconhecidos. Entre os mecanismos propostos para a penetração inicial do vírus na célula estão a entrada direta e indireta (endocitose). A entrada direta dá-se pela clivagem da proteína VP4 em VP5 e VP8, devido a ação da tripsina pancreática ocorrendo a ligação do polipeptídeo VP5 à receptores de membrana independente de ácido siálico, e a ligação do polipeptídeo VP8 às integrinas presentes na membrana celular. A clivagem de VP4 altera a permeabilidade da membrana plasmática devido a ação das proteases, sendo também sugerido que a baixa concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular seja a responsável pela alteração dos trímeros de VP7 em monômeros levando à perda do capsídeo externo e liberando no citoplasma a partícula viral com dupla camada (*double-layered particle* – DLP). Na endocitose é proposto que não haveria ação das proteases e o virion com triplo capsídeo permaneceria aprisionado no endossomo dependendo da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular para ocorrer o desnudamento da partícula viral (DESSELBERGER, 2014; SILVA, 2014).

No citoplasma a partícula viral com dupla camada inicia a replicação, os rotavírus possuem um complexo de transcrição próprio formado pelas proteínas VP1 (RNA polimerase RNA dependente) e VP3 (com fosfodiesterase, guanililtransferase e metilase). Após a ativação desse complexo, ocorre a transcrição dos RNA(+) capeados, que têm função de RNA mensageiro na síntese das proteínas virais e também atua como molde do RNA(-) para a síntese do RNA dupla-fita na replicação viral. As proteínas virais são sintetizadas nos ribossomos livres, exceto as proteínas

VP7 e NSP4, que são sintetizadas nos ribossomos que estão ligados ao retículo endoplasmático rugoso. Próximo ao retículo endoplasmático celular uma grande inclusão citoplasmática é formada à medida que ocorre a síntese e acúmulo de proteínas virais e, essa estrutura amorfa é denominada viroplasma (ALFIERI *et al.*, 2007; DESSELBERGER, 2014).

No viroplasma acontece a montagem das partículas virais e a replicação dos segmentos genômicos dos rotavírus. Após formadas, as partículas virais com dupla camada atravessam por brotamento até o retículo endoplasmático rugoso por ação da proteína NSP4. No retículo endoplasmático rugoso sofrem maturação final com adição de uma camada transitória que em seguida dá lugar a tripla camada. A maturação depende da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular para que as proteínas do capsídeo externo se mantenham estabilizadas. A progênie viral madura perde o envelope e migra até o citoplasma onde é liberada por lise celular, estando assim pronta para infectar outros enterócitos (Figura 3) (ALFIERI *et al.*, 2007; ESTES & KAPIKIAN, 2007; DESSELBERGER, 2014).



**Figura 3.** Esquema da replicação dos rotavírus. ER - Retículo Endoplasmático;  $Ca^{2+}$  - íon cálcio; LC3 - Marcador autofagossomal. (SILVA, 2014).



#### 4. PATOGÊNESE E SINAIS CLÍNICOS DA INFECÇÃO VIRAL

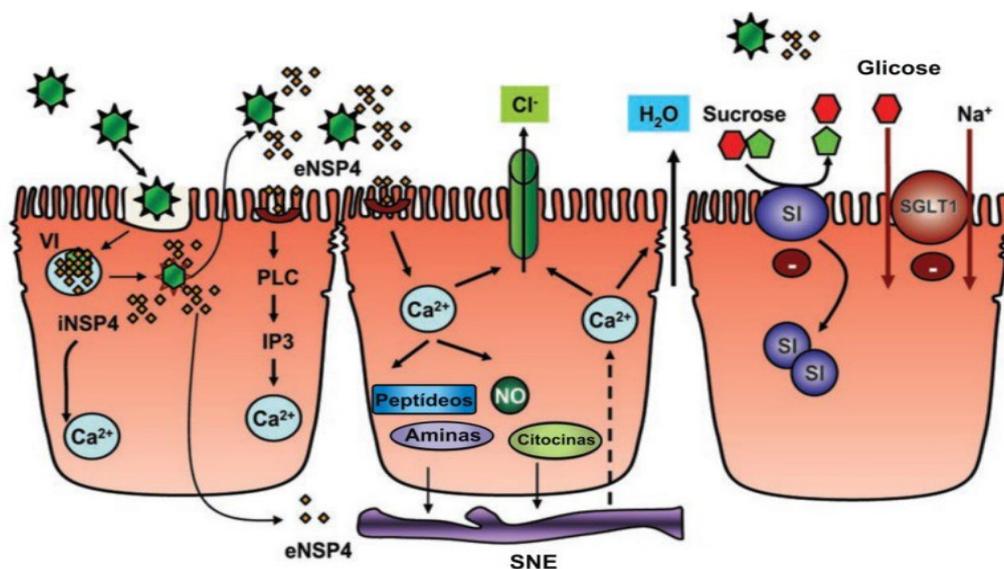
A infecção por rotavírus pode ser assintomática ou sintomática. Para a infecção resultar em sintomatologia clínica de gastroenterite, fatores virais e do hospedeiro são considerados, e o principal fator relacionado ao hospedeiro é a idade. Animais recém-nascidos normalmente são assintomáticos à infecção, devido a transmissão passiva de anticorpos maternos nos primeiros dias de vida, através da ingestão do colostro e da transferência que ocorreu via transplacentária. Os animais adultos também são mais resistentes a infecção uma vez que a reposição do epitélio apical das vilosidades intestinais ocorre intensamente competindo com a replicação do vírus. Assim, a infecção nestes animais é estabelecida quando ocasionada por cepas mais virulentas. Já os animais neonatos, com cerca de duas semanas de vida são os principais acometidos pela rotavirose dada a menor taxa de reposição do epitélio apical das vilosidades intestinais destes animais, o que fisiologicamente favorece a replicação do agente viral (ALFIERI *et al.*, 2007; GREENBERG & ESTES, 2009).

A principal via de transmissão dos rotavírus é a fecal-oral, pelo contato com fômites contaminados e pela ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes (ESTES & KAPIKIAN, 2007 *apud* SOARES, 2011). Há também relatos da possível infecção por aerossóis principalmente em condições ambientais favoráveis de umidade e ventilação (MÉDICI, 2007). Os animais afetados podem excretar até um trilhão de partículas virais por milímetro cúbico de fezes o que torna o ambiente no qual encontram-se bastante contaminado e propício para a transmissão do vírus por contato direto para o restante do rebanho (GREENBERG & ESTES, 2009).

O período de incubação do vírus pode variar entre 1 e 4 dias e ser ainda mais curto em animais neonatos. Os sintomas da infecção incluem febre, vômito e diarreia pastosa à líquida, acompanhados de sinais clínicos típicos das síndromes diarreicas como depressão, anorexia, desidratação e sinais de acidose metabólica como taquicardia e taquipneia. Após a ingestão do vírus o mesmo replica-se nos enterócitos maduros do intestino delgado, para os quais os rotavírus possuem notável tropismo. Esses enterócitos secretam a enzima lactase e também possuem funções absorptivas. A replicação viral determina a descamação epitelial e lise sendo a reposição celular realizada por células cuboides provenientes das criptas intestinais. Por serem imaturas as células cuboides não possuem as mesmas características absorptiva e digestiva dos enterócitos maduros.

Com a interrupção da secreção de lactase é possível observar leite não digerido nas fezes dos animais acometidos pela rotavirose, sendo a doença conhecida também como “de curso branco”, devido a essa alteração fisiológica (ALFIERI *et al.*, 2007; DHAMA *et al.*, 2009; SILVA, 2014).

Diversos mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos no surgimento das diarreias que são uma característica da rotavirose animal. A proteína não-estrutural NSP4 tem ação enterotoxigênica, que desestabiliza a homeostasia dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endoplasmático e quando secretada da célula leva ao aumento intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  nas células adjacentes e à secreção de íons pelas criptas intestinais, ocasionando a diarreia secretória mesmo em ausência de lesão tecidual. A ativação do sistema nervoso entérico (SNE) aumenta a motilidade intestinal em cerca de 67% e induz também diarreia secretória passiva, com ativação das células da cripta para continuarem a secreção de íons e fluidos que são lançados na luz intestinal. O aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a replicação viral também leva a alterações na expressão de enzimas como as dissacaridases, diminuição da função de transportadores SGLT-1 e demais proteínas da membrana dos enterócitos induzindo as diarreias osmóticas e mal absorptivas. No decorrer da infecção células das criptas também são comprometidas e diminui-se a motilidade intestinal, os mecanismos tardios ocorridos e que envolvem a morte dos enterócitos desencadeiam a diarreia mal absorptiva considerada uma característica da doença (ZHANG *et al.*, 2000; FRANCO *et al.*, 2006; ALFIERI *et al.*, 2007; VANUCCI & GUEDES, 2009; SOARES, 2011).



**Figura 4.** Mecanismos envolvidos na patogênese da diarreia causada por rotavírus. A liberação de novos vírus juntamente com a NSP4 aumenta a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$ , desestabilizando o citoesqueleto e causando efluxo de água e



ions Cl<sup>-</sup>. O SNE é estimulado pela NSP4, as aminas e peptídeos liberados. A diminuição das enzimas digestivas e da função da SGLT-1 leva a má digestão de carboidratos (SOARES, 2011).

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no vômito decorrente da rotavirose ainda não foram totalmente elucidados, acredita-se que podem ter origem a partir da liberação de serotonina pelas células enteroendócrinas, a serotonina ativaria os nervos vagos aferentes que estão conectados ao tronco cerebral, especificamente estruturas associadas ao vômito, essa liberação de serotonina seria mediada pela proteína não-estrutural NSP4 (HAGBOM *et al.*, 2011).

Manifestações clínicas atípicas também podem ser observadas na rotavirose, quando os vírus transpõem o trato gastrointestinal podem infectar diversos órgãos, o genoma viral dos rotavírus já foi detectado em pacientes com encefalite, hepatite, nefrite, pneumonia, dentre outras enfermidades (CRAWFORD *et al.*, 2006; BLUTT *et al.*, 2007). Todavia, a doença sistêmica causada pelos rotavírus é rara, apesar da viremia ser encontrada com certa frequência, sendo detectada principalmente em animais imunossuprimidos (DESSELBERGER *et al.*, 2009).

Os sintomas da rotavirose podem ter duração que varia de 4 a 8 dias, a recuperação dos animais acometidos tende a ocorrer em um período curto, pois a diarreia causada é geralmente autolimitante. Entretanto, após o término dos sintomas os animais ainda podem excretar o vírus por até oito dias (MÉDICI, 2007). A maioria dos animais acometidos recuperam-se entre três e quatro dias, contudo a desidratação e as infecções bacterianas secundárias podem levar animais jovens à morte. Os animais recuperados sofrem com a perda de peso ocorrida durante a infecção e podem levar de 10 a 28 dias após a doença para restabelecer seu peso ideal, o que causa uma desuniformidade do lote e grande prejuízo econômico (DHAMA *et al.*, 2009).



## 5. MÉTODOS DE DETECÇÃO DOS ROTAVÍRUS

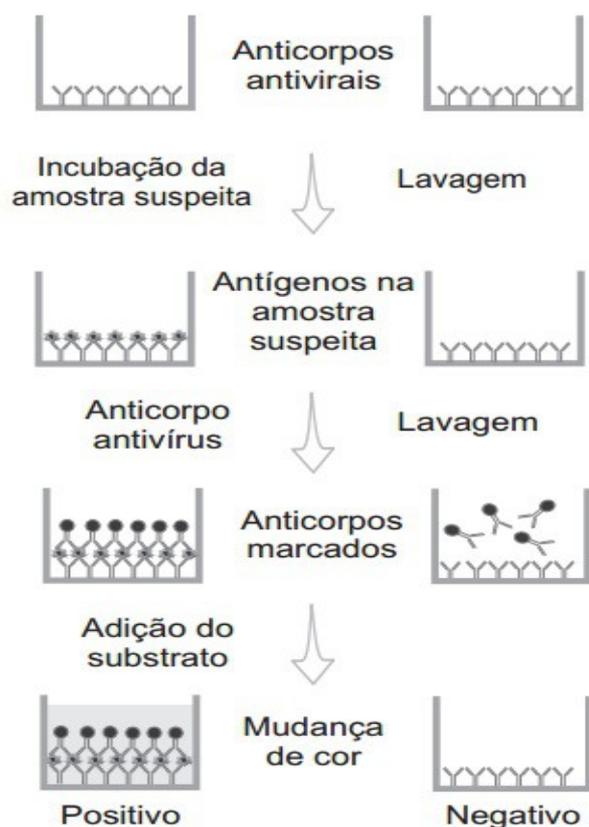
Diversos enteropatógenos como as bactérias, os protozoários e os vírus podem apresentar sintomatologia clínica de infecção entérica de modo bastante semelhante, assim o diagnóstico definitivo da rotavirose depende estritamente de testes laboratoriais, uma vez que a sintomatologia da doença não é patognomônica (ALFIERI *et al.*, 2007). Existem vários métodos de diagnóstico laboratorial para a detecção dos Rotavírus, os quais podem variar entre si quanto à especificidade, sensibilidade, facilidade no método de execução e custo financeiro (ALFIERI *et al.*, 1999).

Para a detecção dos rotavírus podem ser empregadas diversas técnicas laboratoriais, como os testes imunoenzimáticos (ELISA), a Microscopia Eletrônica (ME), a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), o isolamento viral em células de linhagem MA-104b e HT 29, a soroneutralização, a reação de fixação do complemento, a imunofluorescência, a hemaglutinação, a aglutinação em látex, e os métodos moleculares tais como a RT-PCR, RT-PCR *multiplex* e a qPCR (ALFIERI *et al.*, 2007).

O ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA) é um dos métodos mais difundidos na medicina veterinária para o diagnóstico sorológico de várias doenças causadas por vírus, isso dá-se devido a facilidade e rapidez de execução, o baixo custo empregado e a alta sensibilidade deste tipo de ensaio que é bastante difundido para o diagnóstico da rotavirose, especialmente de rotavírus do sorogrupo A. O teste consiste basicamente na incubação da suspensão fecal do paciente em uma placa de poliestireno sensibilizada com anticorpos antivirais, à qual após sucessivas lavagens para remoção de substâncias inespecíficas são adicionados anticorpos antivirais conjugados com uma enzima em que na presença de um substrato específico inicia uma reação colorimétrica (Figura 5) (ALFIERI *et al.*, 2007; MÉDICI, 2007; SILVA, 2014).

Existem, contudo, variações deste teste imunoenzimático, que pode ser realizado de forma direta e indireta, na forma direta os anticorpos primários são conjugados com a enzima e na forma indireta somente os anticorpos secundários são conjugados, ou seja, após a adição dos anticorpos primários e as sucessivas lavagens são adicionados anticorpos secundários marcados e que ligam-se aos anticorpos primários. O ELISA indireto é portanto mais específico que o direto e também mais empregado no diagnóstico sorológico dos rotavírus. Outras variações do teste ELISA também podem ser encontradas, como o ELISA competitivo e o ELISA sanduíche (CROOK & PAYNE,

1980; ALFIERI *et al.*, 2007).

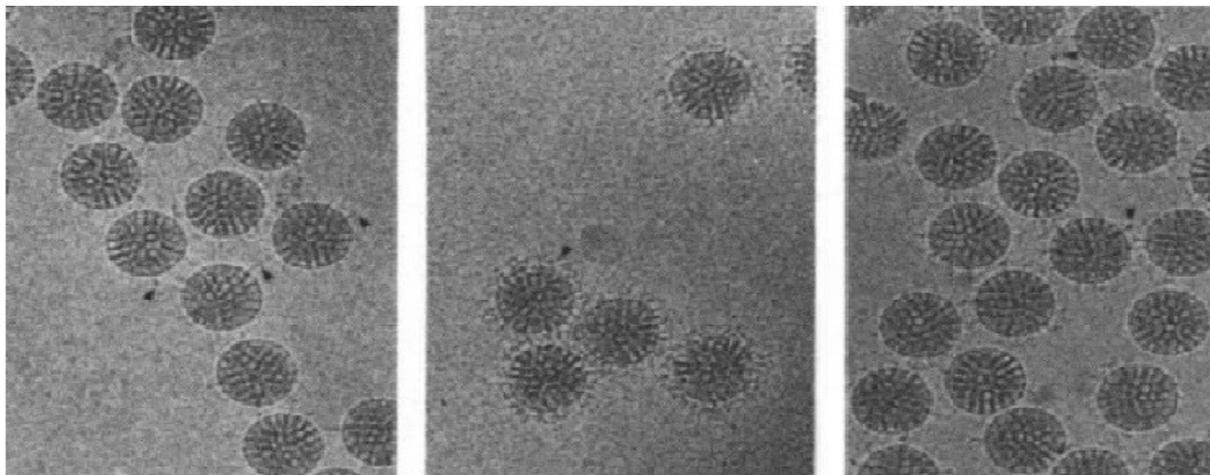


**Figura 5.** Esquemática do teste imunoenzimático ELISA direta, com adição apenas de anticorpos primários (ALFIERI *et al.*, 2007).

Vários *kits* comerciais de ELISA utilizam como base anticorpos anti-VP6 devido a alta antigenicidade e abundância dessa proteína no vírus, que constitui aproximadamente 51% da partícula viral. No entanto, a qualidade dos anticorpos empregados está diretamente relacionada ao sucesso deste método diagnóstico (ALFIERI *et al.*, 2007; SILVA, 2014).

A microscopia eletrônica é uma eficiente ferramenta para a detecção do rotavírus e outros vírus entéricos, uma vez que os rotavírus são excretados em grande quantidade na fase aguda da doença e possuem morfologia típica (Figura 6). Apesar dos rotavírus terem sido descobertos através da microscopia eletrônica esse método possui desvantagens quando aplicado na rotina de diagnóstico, em surtos da doença esta técnica torna-se inviável devido ao grande número de amostras, além disso para ser realizada exige uma alta concentração de vírions nas fezes, sendo

atualmente a microscopia eletrônica mais utilizada em pesquisas e como contraprova para solucionar resultados discrepantes (BRANDT *et al.*, 1981; NAKATA *et al.*, 1987).



**Figura 6.** Imagem obtida através da microscopia eletrônica do Rotavírus (PRASAD, 1990).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), seguida de coloração pela prata, é uma técnica que baseia-se no perfil de migração dos 11 segmentos do genoma de RNA fita-dupla dos rotavírus em um gel de poliacrilamida, graças a característica dos rotavírus em possuírem o seu genoma segmentado é possível observar o padrão genômico ou eletroferotipo viral como método diagnóstico, possibilitando ainda a classificação do vírus nos grupos A, B e C, não sendo esta técnica eficiente, entretanto, para a diferenciação dos sorotipos virais, pois cepas de um mesmo sorotipo podem possuir eletroferotipos distintos e cepas com eletroferotipos semelhantes pertencerem a diferentes sorotipos (KALICA *et al.*, 1978; HERRING *et al.*, 1982; ALFIERI *et al.*, 2007).

Os segmentos genômicos dos rotavírus apresentam diferentes padrões de mobilidade eletroforética, os rotavírus do sorogrupo A possuem os seus 11 segmentos divididos em 4 classes de migração: 1, 2, 3 e 4 pertencem a classe I; 5 e 6 pertencem a classe II; 7, 8, e 9 pertencem a classe III e os demais segmentos 10 e 11 à classe IV. Cada sorogrupo dos rotavírus possui um padrão de migração distinto, a disposição dos segmentos 7, 8 e 9 dos rotavírus do sorogrupo A aparece em forma de trinca devido a massa molecular ser semelhante entre esses segmentos. De acordo com as classes às quais pertencem os segmentos, o padrão de migração mais comum ou típico dos rotavírus do sorogrupo A é estabelecido como 4-2-3-2, ou seja, pode-se observar quatro segmentos na classe

I, dois segmentos na classe II, três segmentos na classe III e dois segmentos na classe IV. Os eletroferotipos que não apresentam a trinca característica dos segmentos 7, 8 e 9 na classe III são denominados rotavírus atípicos ou não-grupo A (Figura 7) (GREGORI, 1999; MÉDICI, 2007).

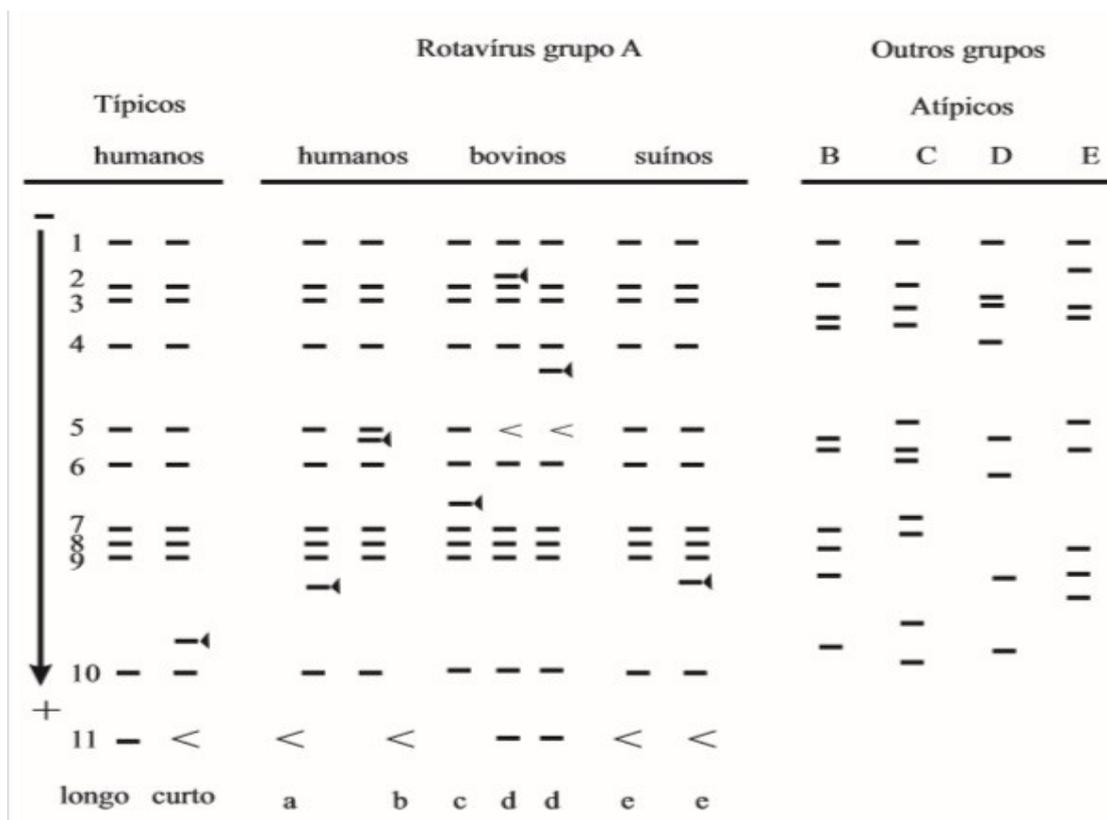


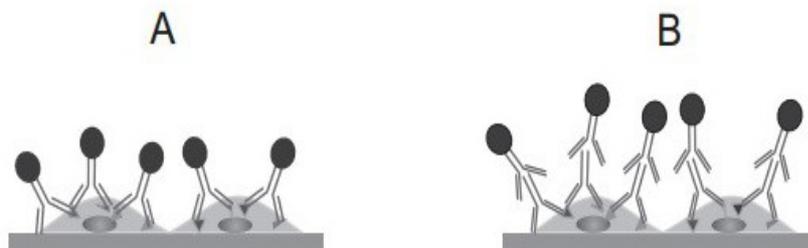
Figura 7. Padrões de migração encontrados nos eletroferotipos do genoma viral dos rotavírus (ALFIERI *et al.*, 2007).

O isolamento viral em cultura de células é uma técnica laboriosa e demorada não sendo utilizada na detecção rotineira do rotavírus em casos de surto. As linhagens celulares MA-104 (originada de rim fetal de macaco Rhesus) e HT 29 (originada de adenocarcinoma retal) são empregadas no cultivo celular do rotavírus, sendo a técnica bastante utilizada em estudos de proposição molecular e antigênica (ALFIERI *et al.*, 2007; STIPP, 2011).

A partir do isolamento viral em cultura de células com boa replicação do vírus, ensaios de soroneutralização podem ser realizados a fim de observar-se a neutralização da infectividade do antígeno viral, sendo possível a realização da soroneutralização para a titulação de anticorpos e para obtenção de resultados positivos e negativos para fins diagnósticos (ALFIERI *et al.*, 2007).

A reação de fixação do complemento baseia-se no complexo antígeno – anticorpo, onde o anticorpo ao interagir com o vírus desencadeia uma cascata de ativação de componentes do sistema complemento, os efeitos da ativação do sistema do complemento podem então ser observados se houver a presença de anticorpos para o antígeno específico. Frequentemente os extratos fecais apresentam anticomplementaridade, devendo-se adicionar soro fetal bovino para a eliminação desse inconveniente e aplicação da técnica mais rotineiramente. Contudo, a aplicação desta técnica atualmente é bastante restrita pois trata-se de uma técnica demorada e laboriosa (CANDEIAS *et al.*, 1978; CANDEIAS *et al.*, 1980; ALFIERI *et al.*, 2007).

A técnica de imunofluorescência (IFA) possui duas variantes, a imunofluorescência direta (IFD) e a imunofluorescência indireta (IFI). A IFA é utilizada para detecção de antígenos e se baseia na reação antígeno – anticorpo, na qual anticorpos marcados emitem luz quando expostos à luz UV, para a execução da técnica exige-se a fixação do material a ser analisado (células descamadas da superfície das vilosidades intestinais) em etanol, metanol ou acetona com posterior incubação com o anticorpo específico conjugado com um fluorocromo, normalmente utiliza-se o *Texas Red* ou FITC (isotiocianato de fluoresceína). Após diversas lavagens para a retirada dos anticorpos que não ligaram-se ao antígeno, o material pode ser analisado utilizando microscópio de luz UV com fundo preto. Na IFD o anticorpo primário é conjugado com o fluorocromo e é o único adicionado a amostra, já na IFI após a incubação com anticorpo primário não-conjugado adiciona-se anticorpos secundários marcados com o fluorocromo que reconhecem e se ligam ao anticorpo primário, sendo esta última mais específica (Figura 8) (ALFIERI *et al.*, 2007).



**Figura 8.** Esquema demonstrativo da técnica de imunofluorescência; A – técnica de imunofluorescência direta com adição de apenas um anticorpo já conjugado com enzima; (B) – técnica de imunofluorescência indireta com anticorpo secundário ligado a anticorpo primário. Adaptado de ALFIERI *et al.*, 2007.

A hemaglutinação (HA) baseia-se na propriedade que alguns vírus possuem de aglutinar



eritrócitos devido a ligação de glicoproteínas de superfície do vírion (hemaglutininas) aos receptores de superfície dos eritrócitos. Contudo, a hemaglutinação possui diversas restrições de execução como a dificuldade em obter resultados positivos utilizando-se pequenas quantidades do vírus, a existência de técnicas mais sensíveis e específicas e também o ocorrência de hemaglutinação inespecífica (ALFIERI *et al.*, 2007). Em um estudo realizado por Nakagomi *et al.*, (1992) uma cepa de rotavírus humana foi capaz de aglutinar eritrócitos de diversos animais, como porcos, ovelhas e galinhas sugerindo a possível infecção do homem por cepas de rotavírus animais (NAKAGOMI *et al.*, 1992).

O ensaio de aglutinação em látex, consiste em um teste bastante simples onde a amostra do paciente é adicionada a anticorpos adsorvidos em partículas de látex, dessa reação é possível observar a aglutinação das partículas na presença do antígeno. A aglutinação em látex devido a sua praticidade poderia ser utilizada para o diagnóstico da rotavirose animal em campo, porém a incidência de resultados falso negativos tem demonstrado-se bastante elevada devido a baixa especificidade e sensibilidade de alguns testes comerciais, outros fatores como a concentração do antígeno nas amostras fecais também são importantes para a ocorrência de resultados dúbios o que torna a hemaglutinação um teste de difícil aplicação atualmente (SANEKATA *et al.*, 1981; ALFIERI *et al.*, 2007).

O advento de técnicas de diagnóstico molecular alavancou os estudos moleculares dos agentes virais, por exemplo, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica muito sensível e específica que consiste em uma reação de síntese *in vitro* de regiões específicas do DNA em ciclos repetidos para amplificação do número de moléculas, podendo-se obter resultados positivos de amostras com quantidade mínima de ácido nucleico do antígeno estudado (SAIKI *et al.*, 1988). A reação de PCR ocorre em três estágios: desnaturação (separação da fita dupla), anelamento (anelamento dos *primers* ao DNA-molde) e extensão (fita complementar é estendida pela enzima taq DNA polimerase), onde cada fase ocorre a diferentes temperaturas e duração, sendo repetidos cerca de 30 a 45 ciclos.

Existem diversas variações da técnica de PCR, como a RT-PCR, RT-PCR *multiplex* e qPCR, todas técnicas utilizadas rotineiramente para amplificação do genoma de RNA dos rotavírus. Por se tratar de um vírus de RNA, há a necessidade de síntese de cópias de DNA complementares ao RNA viral (cDNA), técnica esta denominada transcrição reversa. Na RT-PCR (*reverse transcriptase*



PCR) ocorre a síntese do cDNA, o qual é utilizado como molde para a reação de PCR convencional, a síntese do cDNA pode ser realizada antecipadamente ou conjuntamente a reação de PCR, nos chamados *one step* RT-PCR. A reação de RT-PCR *multiplex* consiste em uma RT-PCR onde são utilizadas mais de uma sequência iniciadora (primers), sendo cada par de primers específicos para diferentes regiões do alvo ou diferentes antígenos, o que é muito interessante quando buscam-se variantes de um mesmo vírus ou antígenos diferentes que causam sintomatologia semelhante, esta técnica leva à uma redução de tempo e custos caso as reações fossem realizadas separadamente (CHAMBERLAIN *et al.*, 1988; ALFIERI *et al.*, 2007).

A qPCR ou PCR em tempo real popularizou-se nos últimos anos em vários campos da ciência (TAYLOR *et al.*, 2010), pois permite além da detecção do antígeno viral, a quantificação e a genotipagem das amostras. Ao contrário do PCR convencional que necessita que o produto da amplificação seja visualizado em gel de agarose, na PCR em tempo real enquanto ocorre a amplificação há a emissão de fluorescência por fluoróforos que é medida a cada ciclo da reação. Existem algumas tecnologias envolvidas atualmente na técnica de PCR em tempo real como o SYBR Green®, na qual o mesmo liga-se entre a fita dupla de DNA formado emitindo fluorescência, e o TaqMan®, no qual uma sonda específica marcada com um fluoróforo em sua extremidade emite a fluorescência quando hibridizada com o DNA alvo. Ambas as técnicas possuem vantagens e desvantagens devendo-se adequar cada uma ao objetivo proposto (HEID *et al.*, 1996; SCHMITTGEN *et al.*, 2000).



## 6. TRATAMENTO, CONTROLE E PROFILAXIA

A rotavirose quando diagnosticada corretamente deve ser imediatamente tratada, controlada dentro do rebanho e eliminada. O prejuízo econômico que a doença pode acarretar para um produtor é grande, mesmo tratando-se de um agente etiológico de baixa mortalidade, a alta morbidade dos rotavírus é preocupante já que a doença se alastra rapidamente e os animais acometidos sofrem uma acentuada perda de peso levando a uma desuniformidade marcante no lote (ALFIERI *et al.*, 2007).

O tratamento da infecção por rotavírus é sintomático e baseia-se na reposição de fluidos e eletrólitos que são perdidos durante o curso da doença. A administração de antibióticos de amplo espectro também é importante para o controle das infecções bacterianas secundárias que surgem nos animais doentes (MORES *et al.*, 1987). Em pequenos animais como cães e gatos pode ser necessária a internação em casos mais graves com desidratação severa, além do tratamento já descrito esses animais devem receber também antieméticos e nutrição microenteral (NELSON & COUTO, 2009).

Ao contrário das demais infecções causadoras de gastroenterite a adoção de medidas higiênico-sanitárias isoladamente não reduzem a incidência da rotavirose em um rebanho, mesmo propriedades que dispõem de aparato tecnológico e realizam manejo zootécnico e sanitário adequados sofrem o impacto econômico causado por essa doença. Isso deve-se ao fato do agente etiológico possuir características singulares e importantes, dentre elas: os rotavírus possuem uma grande gama de hospedeiros susceptíveis e possui transmissão entre espécies diferentes; os animais infectados excretam cerca de  $10^{11}$  partículas virais em suas fezes durante o período agudo da doença; estas partículas são resistentes às condições ambientais, à variações de pH 3-9 e a determinados desinfetantes rotineiros podendo perdurar no ambiente por longos períodos; e os animais adultos podem desenvolver infecção subclínica e contaminar os animais jovens (ALFIERI *et al.*, 2007; MÉDICI, 2007; DHAMA *et al.*, 2009).

Dessa maneira o manejo profilático deve adequar-se às características desse agente etiológico, preconizando-se: o isolamento dos animais acometidos para evitar a contaminação dos animais sadios; a uniformização dos lotes pela idade evitando o contato dos animais jovens com adultos que podem portar a doença de forma subclínica e contaminar os demais; a realização de vazio sanitário após a saída de um lote; a desinfecção das instalações com soluções desinfetantes



como o glutaraldeído a 2%, o formaldeído a 37%, a formalina e o lisol; e a administração de colostro aos animais recém-nascidos (LLOYD-EVANS *et al.*, 1986; DHAMA *et al.*, 2009; ALFIERI *et al.*, 2007).

A existência de diversos tipos de sistemas de produção animal pode facilitar ou dificultar o manejo profilático no rebanho, nos sistemas de produção extensivos a dificuldade de se conter a expansão da doença é maior, pois geralmente neste sistema de criação não há separação dos animais por idade ou um bom isolamento dos animais infectados pelo rotavírus. No caso dos rebanhos bovinos criados extensivamente a realização de rodízio de piquetes de parição deve ser adotada com finalidade de diminuir a incidência da doença. Na criação de aves além do vazio sanitário, limpeza e desinfecção das instalações, a prevenção da doença é feita adotando-se o descarte imediato de refugos com sinais da doença, implementando-se o manejo “*all in all out*” (todos dentro todos fora), e rigoroso controle de temperatura, ventilação e umidade nos galpões (BESERRA, 2012).

Atualmente, o principal manejo profilático empregado nos rebanhos brasileiros baseia-se no uso de vacinas inativadas e atenuadas anti rotavírus sorogrupo A em fêmeas no terço final da gestação, com o objetivo de elevar o título de anticorpos específicos contra o rotavírus no colostro (ALFIERI *et al.*, 2007), a presença destes anticorpos no lúmen intestinal é primordial para o desenvolvimento de proteção contra a doença nos animais neonatos. Em bovinos preconiza-se a administração do colostro proveniente de fêmeas vacinadas nos primeiros 5 dias de vida dos bezerros, porém, a imunidade passiva conferida a estes animais não é eficaz na presença de grandes quantidades do vírus. O colostro de origem bovina também pode ser administrado em potros recém-nascidos por 3 a 5 dias, pois reduz a incidência de diarreias virais nestes animais. Demais animais de produção como os suínos, equinos, caprinos e ovinos também têm diminuição da ocorrência de diarreias por rotavírus quando recebem colostro de fêmeas vacinadas no terço final da gestação. A vacina anti rotavírus não é comercializada para cães, gatos e aves (DHAMA *et al.*, 2009).

Contudo, a produção de vacinas efetivas em animais é um constante desafio no manejo profilático da rotavirose, os rotavírus possuem grande variabilidade antigênica e molecular sendo necessários estudos dos genótipos P e G das cepas virais circulantes para o planejamento de um programa de vacinação eficiente. Atualmente são escassos os estudos brasileiros acerca da circulação de cepas variantes de rotavírus assim como de sua distribuição temporal, sabe-se que fatores como a diversidade de hospedeiros susceptíveis à doença e os mecanismos evolutivos



apresentados pelos rotavírus colaboram para o surgimento de novos genótipos, a ausência de monitoramento de novos genótipos circulantes acaba dificultando a profilaxia da rotavirose nos rebanhos nacionais (ALFIERI *et al.*, 2007; SILVA, 2014).



## 7. EPIDEMIOLOGIA DAS INFECÇÕES POR ROTAVÍRUS EM ANIMAIS

Os rotavírus têm distribuição mundial e já foram detectados em surtos de diarreia em animais de diversas espécies, a rotavirose é atualmente uma das principais causas de diarreia em animais criados em sistemas intensivos (SAIF, 2011).

Em suínos, os rotavírus dos sorogrupos A, B e C assumem grande importância epidemiológica, contudo de acordo com a frequência das diarreias os rotavírus do sorogrupo A são os mais prevalentes. A rotavirose suína acomete animais entre a primeira e quarta semana de vida alojados na maternidade e na creche. Os leitões jovens também são susceptíveis a diferentes infecções, sendo assim diversas outras doenças devem ser consideradas para o diagnóstico diferencial da rotavirose, como as infecções por *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, calicivírus, coronavírus e astrovírus, os rotavírus juntamente com alguns destes outros agentes infecciosos estão envolvidos no complexo diarreico neonatal suíno que configura o principal problema sanitário nas fases de creche e maternidade (ALFIERI *et al.*, 2007; DHAMA *et al.*, 2009).

Em estudo realizado no Brasil Alfieri *et al.* (1999) observaram maior frequência da rotavirose em animais no período de desmame, em outros estudos é possível observar diversas taxas de prevalência dos rotavírus nos rebanhos suínos brasileiros, Lippke *et al.* (2011) encontrou prevalência de 39,29% de rotavírus em leitões neonatos, Gregori *et al.* (2009) encontraram os rotavírus com uma frequência de 29,86% nas fezes de leitões diarreicos de 10 municípios de São Paulo. Estes estudos demonstram a ampla disseminação do agente na indústria suínica nacional.

A rotavirose aviária ocorre em aves jovens, principalmente nas primeiras quatro semanas de vida destes animais, isto configura um grave problema na produção de frango de corte, considerando-se que atualmente as aves são abatidas com uma média de 42 dias, ou seja, são susceptíveis a forma clínica da infecção por quase todo o seu período de vida, além de viverem agrupadas em grandes lotes facilitando a rápida disseminação da doença. Assim como nos mamíferos a via de transmissão dos rotavírus em aves ocorre por via fecal-oral e pela ingestão de água e alimentos contaminados, contudo relatos do isolamento do agente viral em perus com três dias de vida sugerem uma possível transmissão via casca do ovo ou transovariana (BESERRA, 2012). Em estudo realizado com aves brasileiras, Beserra (2012) identificou os rotavírus do sorogrupo A com uma frequência de 38,73% e do sorogrupo D com uma frequência de 6,3%, neste



experimento foram utilizadas aves de diversos tipos de criação comercial como: frangos de corte, poedeiras e matrizes, o que demonstra a disseminação do agente nas diferentes modalidades de criações do país (BESERRA, 2012).

Na rotavirose bovina os rotavírus infectam bezerros nas primeiras semanas de vida e são um dos responsáveis pelo complexo de diarreia neonatal que acomete esses animais, a diarreia neonatal é uma das mais importantes causas de mortalidade em neonatos e desencadeia relevantes perdas econômicas. Em bovinos a doença é causada principalmente por rotavírus do sorogrupo A, Alfieri *et al.* (2006) realizaram um estudo com rebanhos bovinos de sete estados brasileiros em um intervalo de 5 anos utilizando a técnica de PAGE para o diagnóstico do rotavírus em animais com e sem sintomatologia de diarreia, e encontrou rotavírus do sorogrupo A infectando 19,5% dos bezerros diarreicos observados, essa proporção englobou animais de todos os períodos e regiões estudadas confirmando a importância dessa doença entérica na criação de bovinos no Brasil (ALFIERI *et al.*, 2006; FREITAS *et al.*, 2011).



## 8. ASPECTOS ZOONÓTICOS DA ROTAVIROSE

Os rotavírus são geralmente espécie específicos, entretanto diversos casos de infecções entre espécies podem ser encontrados descritos na literatura, também chamadas de infecções heterólogas estas infecções ocorrem quando uma espécie animal é infectada por um rotavírus de outra espécie podendo ocorrer de forma experimental ou natural, os rotavírus capazes de promover este tipo de infecção geralmente possuem segmentos genômicos de ambas as cepas humana e animal (ALFIERI *et al.*, 2007; MARTELLA *et al.*, 2009).

As semelhanças antigênicas de cepas humanas e animais dos rotavírus levantou durante muitos anos dúvidas acerca do papel dos animais como fonte de rotavírus para a infecção em seres humanos. Posteriormente, com a hibridização RNA-RNA foi possível verificar que as cepas de rotavírus de uma mesma espécie animal possuem alta homologia, o que não ocorre entre cepas de diferentes espécies. Os rotavírus com baixa homologia possuem maiores dificuldades de replicação em um hospedeiro não-específico, ou seja, um rotavírus animal possui maior dificuldade de replicar-se em enterócitos humanos em condições naturais. Contudo, com a identificação de cepas não usuais em humanos e com propriedades comumente encontradas em animais, uma via alternativa do potencial zoonótico dos rotavírus foi levantada, aonde cepas de rotavírus animal poderiam promover a infecção em humanos graças às reestruturações gênicas (COOK *et al.*, 2004).

Dentre os mecanismos evolutivos apresentados pelos rotavírus, as reestruturações gênicas ou *reassortments* são importantes para a formação de novas cepas virais. As reestruturações ocorrem quando duas cepas virais distintas, que podem ser humanas e animais infectam uma mesma célula, no processo de replicação viral estas cepas podem trocar segmentos genômicos dando origem à cepas com genoma reestruturado que podem conter segmentos virais humanos e animais. Os 11 segmentos genômicos de uma única cepa viral pode sofrer reestruturações randômicas que podem gerar até 2048 constelações gênicas (COOK *et al.*, 2004).

Em estudo realizado no Reino Unido Cook *et al.* (2004) apontaram diversas rotas de transmissão em que rotavírus animais podem infectar humanos, destacando-se: o contato direto com animais domésticos e suas respectivas excretas; e ainda o contato com água, superfícies e alimentos contaminados. O contato direto com animais domésticos e suas respectivas excretas é considerado mais comum em países em desenvolvimento, contudo também em países desenvolvidos são



encontrados relatos da detecção de cepas incomuns de rotavírus em fezes humanas. Birch *et al.*, (1985) encontraram cerca de 5% de uma população de gatos saudáveis residentes de um abrigo para animais na Austrália portando rotavírus A associado ao genótipo G3, no mesmo período as infecções humanas por rotavírus também foram causadas por rotavírus A genótipo G3, o que não descarta a possibilidade de transferência entre espécies.

Atualmente, também é fácil encontrar relatos na literatura de detecção de cepas incomuns de rotavírus em humanos, Luchs *et al.*, (2014) encontraram em 2012 uma cepa G10P nas fezes de uma criança com gastroenterite na cidade de Presidente Prudente, interior de São Paulo, o genótipo G10 é geralmente detectado em bezerros. A transmissão entre espécies de animais domésticos também pode ocorrer com frequência, Sieg *et al.* (2015) isolaram o genótipo G8P[1] tipicamente bovino em um cão assintomático na cidade de Leipzig na Alemanha. Em dezembro de 2010 a Organização Mundial da Saúde divulgou dados de um programa de vigilância da rotavirose humana realizado em países em desenvolvimento, no estudo foram identificados os genótipos de cepas incomuns mais predominantes em determinadas regiões (WHO, 2011), os genótipos encontrados neste estudo são os mesmos responsáveis por cerca de 75% das gastroenterites por rotavírus sorogrupo A no Brasil (SILVA, 2014).

A rotavirose tem grande impacto na saúde humana, os rotavírus do sorogrupo A são os principais responsáveis por gastroenterites em crianças menores de 5 anos, causando cerca de 193.000 mortes anualmente, principalmente em países em desenvolvimento (WALKER *et al.*, 2013). Porém, o impacto das novas cepas virais de rotavírus na saúde pública ainda não é bem definido pois há uma ausência de dados epidemiológicos acerca do genoma e da circulação das mesmas em possíveis reservatórios animais, estes animais poderiam no futuro introduzir na população humana novas cepas de rotavírus ou novos segmentos genômicos em cepas de rotavírus humano. Mesmo a transmissão de rotavírus animal para humanos não resultando em infecção relevante, o fato das cepas animais participarem na formação de novas cepas virais que podem ser patogênicas para o homem, denota a necessidade de criar programas de vigilância para o monitoramento da rotavirose animal e humana conjuntamente, com o objetivo de aumentar o número de dados acerca da circulação dos rotavírus nesses grupos, pois a circulação dessas novas variantes de rotavírus animal pode afetar a eficácia das vacinas humanas atualmente disponíveis (MIDGLEY *et al.*, 2012).



## 9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os rotavírus são identificados em todo o mundo como um dos mais importantes agentes etiológicos virais causadores de diarreia em humanos e animais. Estes vírus estão altamente disseminados nos rebanhos brasileiros interferindo nos principais e maiores setores produtivos como a bovinocultura, suinocultura e avicultura. As síndromes diarreicas em que os rotavírus estão envolvidos causam alto prejuízo econômico em rebanhos de todo o mundo, pois acarretam despesas adicionais com mão de obra e tratamento aumentando os custos de produção.

Apesar de seu potencial zoonótico levantar inúmeras questões acerca da infecção por cepas de rotavírus animais não promoverem infecção satisfatória em humanos, o fato dessas cepas animais trocarem segmentos genômicos com cepas humanas aumentando a variabilidade genética e a patogenicidade dos rotavírus para seres humanos, tornam este um agente etiológico de importante monitoramento pelos serviços de vigilância, os quais devem acompanhar o surgimento de novas cepas de rotavírus em humanos e animais concomitantemente.

Atualmente, a vacinação é a principal forma de prevenção da doença em animais. A vacinação contra a doença no Brasil só é realizada em fêmeas no terço final da gestação, além disso desde a introdução da vacina em território nacional são escassos os trabalhos científicos sobre o surgimento de cepas vacinais e estudos epidemiológicos acerca dos genótipos circulantes em determinadas espécies e regiões. Somente com tais levantamentos será possível aprimorar a vacina utilizada em território nacional e correlacionar a presença de genótipos incomuns com a doença em humanos.



## PARTE II

### RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

#### 1. INTRODUÇÃO

Para encerrar a formação do profissional em Medicina Veterinária é necessária a realização de um estágio supervisionado, que tem como objetivo a prática do conteúdo aprendido ao longo do curso, porém, mais voltado para uma área de interesse do formando. O estágio supervisionado é uma disciplina de caráter obrigatório e que faz parte da matriz curricular do curso de medicina veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, sendo realizado no último semestre do curso de graduação. O estágio deve ser realizado em uma ou mais áreas de interesse do discente e em instituições ou estabelecimentos veterinários de sua preferência. Um total de 480 horas devem ser cumpridas durante o estágio supervisionado, as quais podem ser divididas em até dois locais. Essa atividade visa o aperfeiçoamento do conhecimento prático e teórico adquirido durante a graduação, preparando e aprimorando o discente para sua atuação no mercado de trabalho. As atividades desenvolvidas durante tal período devem ser supervisionadas por um professor do curso de medicina veterinária ou credenciado para tal fim, como requisito final deve-se apresentar um relatório de atividades executadas, monografia, artigo para publicação ou produto desenvolvido a ser julgado por uma banca avaliadora.

Realizei o meu estágio supervisionado obrigatório em apenas uma instituição: o Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz – LVCA/FIOCRUZ, na área de virologia clínica, no setor de diagnóstico sorológico e molecular de gastroenterites de etiologia viral, especificamente o rotavírus, sob supervisão do Dr. José Paulo Gagliardi Leite. As 480 horas exigidas foram cumpridas durante três meses, de segunda a sexta-feira.



## **2. LABORATÓRIO DE VIROLOGIA COMPARADA E AMBIENTAL – FIOCRUZ**

O Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental (LVCA) é um laboratório credenciado pelo Ministério da Saúde como referência no diagnóstico de gastroenterites virais, o seu credenciamento encontra-se renovado até o ano de 2021. A missão do LVCA é realizar pesquisa, desenvolvimento tecnológico, inovação e formação de recursos humanos relacionados aos estudos comparativos de vírus responsáveis pela etiologia das gastroenterites agudas e de outros agravos para a saúde pública, sanidade animal e impacto ambiental.

Atualmente, o LVCA divide-se em dois setores: de Virologia Ambiental, aonde está inserida a Referência em Virologia Ambiental e de Virologia Clínica, aonde está inserida a Referência Regional para Rotavíruses. O setor de virologia clínica do LVCA é responsável pelo diagnóstico definitivo de amostras suspeitas de gastroenterites virais provenientes de Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN's) de diversos estados brasileiros. Essas amostras são triadas em seus estados de origem através de testes sorológicos como o ELISA e enviadas ao LVCA para demais diagnósticos confirmativos, com isso há um controle de qualidade rigoroso praticado no laboratório, desde o recebimento das amostras até a emissão dos laudos. O setor de virologia ambiental trabalha com a detecção e recuperação de vírus gastroentéricos em águas recreacionais, de consumo e de esgotos, em superfícies hospitalares e também com detecção de vírus em alimentos.

A entrada nas instalações do LVCA segue um fluxograma contínuo, sendo vedado o acesso em locais em que o fluxograma não é respeitado. De acordo com o fluxograma atual do laboratório as salas são classificadas como limpas e sujas conforme as atividades que são executadas no local. A sala em que se encontram os reagentes livres de ácidos nucleicos para preparação de MIX para reações de PCR é considerada uma sala limpa, já as salas de extração e análise de ácidos nucleicos são consideradas sujas, sendo assim somente é autorizada a entrada em uma sala limpa de pessoas que ainda não entraram em nenhuma sala de trabalho ou que saíram de uma sala também limpa. É estritamente vedada a entrada em uma sala limpa a partir de uma sala suja e, tal medida tem sido adotada com êxito para diminuir os riscos de contaminação.

A diminuição dos riscos de contaminação é algo encarado com bastante seriedade pela equipe do LVCA. Todas as atividades realizadas no laboratório são executadas por profissionais treinados,



seguindo Procedimentos Operacionais Padrões (POP's) validados e com o máximo de rastreabilidade.

As atividades do estágio foram divididas de maneira temporal, para que ao longo dos três meses fosse acompanhado todo o processo de diagnóstico sorológico e molecular do rotavírus, a partir do recebimento das amostras até a emissão dos laudos finais. Para iniciar as atividades no laboratório realizei o treinamento inicial em biossegurança com duração de uma semana e cadastramento no sistema de qualidade do laboratório, uma vez que apenas profissionais cadastrados podem executar atividades no LVCA.

O estágio iniciou-se no setor de recebimento e processamento de amostras, o qual teve a duração de três semanas, neste setor as amostras fecais oriundas dos LACEN's são armazenadas em freezer para a preparação das suspensões fecais, as suspensões fecais são preparadas a 10% e armazenadas em freezer a 4°C, até serem submetidas aos ensaios de triagem PAGE e ELISA indireta, atualmente o LVCA não realiza rotineiramente testes de ELISA uma vez que dispõe de testes moleculares mais sensíveis e específicos. Para a realização do PAGE as suspensões fecais são enviadas até a sala de extração de ácidos nucleicos, o material é extraído por um robô de extração QIAcube e devolvido para a execução do PAGE.

Após o primeiro mês e pelos dois meses seguintes, o treinamento seguiu-se no setor de biologia molecular que é constituído pelas salas de reagentes livres de ácidos nucleicos, extração de ácidos nucleicos e análise de ácidos nucleicos, esta última dividida entre sala de termocicladores, sala de preparação de gel e sala de fotodocumentação. Na sala de reagentes livres de ácidos nucleicos são preparados os MIX para as PCR's, esta sala constitui um ambiente limpo em que é proibida a entrada de amostras com suspeitas de infecções virais. Após a preparação do MIX, o mesmo é levado até a sala de extração de ácidos nucleicos aonde as amostras são distribuídas, quando necessário o uso de cDNA a preparação do mesmo também é realizada nesta sala que possui um termociclador exclusivo para este fim no local. Os demais termocicladores do laboratório ficam localizados na sala de termocicladores, o produto da PCR é armazenado sempre no freezer localizado na sala de preparação de gel. A sala de preparação de gel, considerada uma sala suja, é utilizada quando trabalha-se com PCR's convencionais e há a necessidade de execução de eletroforese em gel de agarose para análise dos amplicons. A sala de fotodocumentação abriga fotodocumentadores e impressoras, aonde o gel de agarose é visualizado e documentado.



Atualmente, são realizadas PCR convencionais e especialmente qPCR para detecção de Rotavírus e Norovírus nas amostras que chegam ao LVCA, a execução de qPCR é preconizada em todas as amostras que chegam ao LVCA. As amostras positivas podem ser sequenciadas quando há interesse, o que ocorre principalmente nos casos de surtos, por tratar-se também de um laboratório de pesquisa o sequenciamento das amostras é de interesse para posteriores análises de filogenia e da variabilidade genética ocorrida nas cepas virais após a introdução da vacina anti rotavírus nos programas nacionais de vacinação brasileiros.

Ao fim do estágio, foi necessário apresentar um seminário sobre a rotavirose em animais, pois atualmente o LVCA não possui nenhum médico veterinário em seu quadro de estudantes de pós-graduação e funcionários, sendo assim, o tema escolhido foi importante para informar sobre a doença e seus prejuízos na produção animal nacional ao staff atual do laboratório.

O quadro 1 apresenta os testes laboratoriais acompanhados no LVCA durante os três meses de estágio.

	<b>Período</b>	<b>Número de amostras</b>
Treinamento em biossegurança	02/03 a 06/03	-
Preparação de suspensões fecais	09/03 a 27/03	144
ELISA indireto	09/03 a 27/03	-
Eletroforese em gel de poliacrilamida	09/03 a 27/03	96
Extração de ácidos nucleicos por Kit comercial	30/03 a 29/05	104
Extração de ácidos nucleicos com sílica	30/03 a 29/05	32
Transcriptase reversa para preparação de cDNA	30/03 a 29/05	104
PCR convencional	30/03 a 29/05	233
One Step RT-PCR	30/03 a 29/05	30
qPCR – Tempo Real	30/03 a 29/05	192
Eletroforese em gel de agarose	30/03 a 29/05	<b>233</b>
Purificação de DNA para sequenciamento	30/03 a 29/05	27

**Quadro 1.** Métodos executados durante o período de estágio com distribuição temporal e número total de amostras.



### **3. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O período de estágio supervisionado obrigatório na área de interesse foi fundamental para minha formação como profissional em medicina veterinária. Esse período em um laboratório de referência para o diagnóstico de gastroenterites de etiologia viral possibilitou agregar notável aproveitamento acadêmico e pessoal. O LVCA possui estrutura, recursos e controle de qualidade diferenciados, dando todo o suporte necessário para um aprendizado prático de excelência.

O treinamento realizado no diagnóstico da rotavirose humana não apenas instruiu-me acerca de novas técnicas e procedimentos laboratoriais como dimensionou positivamente a preocupação e importância que deve ser dada a essa doença tanto no âmbito da saúde pública, como no da sanidade animal.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, W. R.; KRAFT, L. M. Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. **Science**, v. 141, n. 3578, p. 359-360, 1963.

ALFIERI, A. F. Caracterização dos genótipos P e G de rotavírus do grupo A de origem animal (bovina e suína) e de origem humana pela reação em cadeia pela polimerase. 1999. **Tese de Doutorado**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

ALFIERI, A. A., ALFIERI, A. F., BEUTTEMMÜLLER, E. A., DE BRITO, B. G., MEDICI, K. C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região Sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 20, n. 1, p. 5-11, 1999.

ALFIERI, A. A., PARAZZI, M. E., TAKIUCHI, E., MÉDICI, K. C., ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, n. 7-8, p. 521-526, 2006.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUSHI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In FLORES, E.F. (Org.). **Virologia Veterinária**, Santa Maria: Editora da UFSM; p.775- 805, 2007.

BERN, C. & GLASS, R.I. Impact of diarrhea diseases worldwide. In: KAPIKIAN, A.Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2.ed. New York: Marcel-Dekker, 1994. p.1-24

BESERRA, L. Ocorrência e caracterização de rotavírus em frangos de corte, poedeiras e matrizes de criações comerciais brasileiras. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.



BIRCH, C. J., HEATH, R. L., MARSHALL, J. A., LIU, S., GUST, I. D. Isolation of feline rotaviruses and their relationship to human and simian isolates by electropherotype and serotype. **The Journal of general virology**, v. 66, p. 2731, 1985.

BISHOP, R., DAVIDSON, G. P., HOLMES, I. H., & RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **The Lancet**, v. 302, n. 7841, p. 1281-1283, 1973.

BLUTT, S. E., MATSON, D. O., CRAWFORD, S. E., STAAT, M. A., AZIMI, P., BENNETT, B. L., CONNER, M. E. Rotavirus antigenemia in children is associated with viremia. **PLoS medicine**, v. 4, n. 4, p. 660, 2007.

BRANDT, C. D., KIM, H. W., RODRIGUEZ, W. J., THOMAS, L., YOLKEN, R. H., ARROBIO, J. O., CHANOCK, R. M. Comparison of direct electron microscopy, immune electron microscopy, and rotavirus enzyme-linked immunosorbent assay for detection of gastroenteritis viruses in children. **Journal of clinical microbiology**, v. 13, n. 5, p. 976-981, 1981.

CANDEIAS, J. A. N.; ROSENBERG, Cornélio P.; RACZ, M. L. Identificação por contraímunoeletroforese de rotavírus em casos de diarreia infantil. **Rev. Saúde públ**, p. 99-103, 1978.

CANDEIAS, J. A. N., RÁCZ, M. L., BREVIGLIERI, J. C., ROSENBERG, C. P., CANDEIAS, J. A. reação de fixação do complemento na identificação de rotavírus humano. **Revista de Saúde Pública**, v. 14, n. 3, p. 420-424, 1980.

CHAMBERLAIN, J. S., GIBBS, R. A., RAINER, J. E., NGUYEN, P. N., THOMAS, C. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 23, p. 11141-11156, 1988.

COOK, N., BRIDGER, J., KENDALL, K., GOMARA, M. I., EL-ATTAR, L., & GRAY, J. The



zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infection**, v. 48, n. 4, p. 289-302, 2004.

CRAWFORD, S. E., PATEL, D. G., CHENG, E., BERKOVA, Z., HYSER, J. M., CIARLET, M., ESTES, M. K. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal rat model. **Journal of virology**, v. 80, n. 10, p. 4820-4832, 2006.

CROOK, N. E.; PAYNE, C. C. Comparison of three methods of ELISA for baculoviruses. **Journal of General Virology**, v. 46, n. 1, p. 29-37, 1980.

DHAMA, K., CHAUHAN, R. S., MAHENDRAN, M., & MALIK, S. V. S. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary research communications**, v. 33, n. 1, p. 1-23, 2009.

DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of rotaviruses. **Archives of virology. Supplementum**, v. 12, p. 37, 1996.

DESSELBERGER, U., MANKTELOW, E., LI, W., CHEUNG, W., ITURRIZA-GÓMARA, M., & GRAY, J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **British medical bulletin**, v. 90, n. 1, p. 37-51, 2009.

DESSELBERGER, U. Rotaviruses. **Virus research**, v. 190, p. 75-96, 2014.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses, p 1917–1974. **Fields virology**, v. 2, 2007.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, Heather. Virus particles in gastroenteritis. **The Lancet**, v. 302, n. 7844, p. 1497, 1973.

FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H.; WOODE, G. N.; BRIDGER, J.; DERRICK, J. Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. **The Lancet**, v. 304, n. 7872, p. 61-63, 1974.



- FLEWETT, T. H.; WOODE, G. N. The rotaviruses. **Archives of virology**, v. 57, n. 1, p. 1-23, 1978.
- FRANCO, M. A.; ANGEL, J.; GREENBERG, H. B. Immunity and correlates of protection for rotavirus vaccines. **Vaccine**, v. 24, n. 15, p. 2718-2731, 2006.
- FREITAS, P. P. S; UYEMURA, S.A.; SILVA, D.G.; SAMARA, S.I.; BUZINARO, M.G. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, p. 820-827, 2011.
- GOUVEA, V.; BRANTLY, M. Is rotavirus a population of reassortants? **Trends in microbiology**, v. 3, n. 4, p. 159-162, 1995.
- GREENBERG, H. B.; ESTES, M. K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1939-1951, 2009.
- GREGORI, F., ROSALES, C. A., BRANDÃO, P. E., SOARES, R. M., & JEREZ, J. A. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras**, v. 29, n. 9, p. 707-712, 2009.
- HAGBOM, M., ISTRATE, C., ENGBLOM, D., KARLSSON, T., RODRIGUEZ-DIAZ, J., BUESA, J., SVENSSON, L. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 7, p. e1002115-e1002115, 2011.
- HAYNES, J. S., REYNOLDS, D. L., FAGERLAND, J. A., FIX, A. S. Morphogenesis of enteric lesions induced by group D rotavirus in ringneck pheasant chicks (*Phasianus colchicus*). **Veterinary Pathology Online**, v. 31, n. 1, p. 74-81, 1994.
- HEID, C. A., STEVENS, J., LIVAK, K. J., & WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR.



**Genome research**, v. 6, n. 10, p. 986-994, 1996.

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

HOLLAND, R. E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clinical microbiology reviews**, v. 3, n. 4, p. 345-375, 1990.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A. Z. **Classification of rotavirus VP4 and VP7 serotypes**. Springer Vienna, 1996.

ITURRIZA-GÓMARA, M., ISHERWOOD, B., DESSELBERGER, U., & GRAY, J. I. M. 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, n. 8, p. 3696-3705, 2001.

KALICA, A. R., SERENO, M. M., WYATT, R. G., MEBUS, C. A., CHANOCK, R. M., KAPIKIAN, A. Z. Comparison of human and animal rotavirus strains by gel electrophoresis of viral RNA. **Virology**, v. 87, n. 2, p. 247-255, 1978.

KANEENE, J. B.; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, n. 2, p. 127-140, 1990.

LIMA, R; DIAS, J. Gastroenterite aguda. In: **Nascer e Crescer, revista do hospital de crianças Maria Pia**, vol XIX, n 2, 2010.

LIPPKE, R. T., BOROWSKI, S. M., MARQUES, S. M., PAESI, S. O., ALMEIDA, L. L., MORENO, A. M., DE BARCELLOS, D. E. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 505-510, 2011.

LLOYD-EVANS, N.; SPRINGTHORPE, V. S.; SATTAR, S. A. Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces. **Journal of hygiene**, v. 97, n. 01, p. 163-173, 1986.

LUCHS, A.; TIMENETSKY, M. C. S. T. Unexpected detection of bovine G10 rotavirus in a



- Brazilian child with diarrhea. **Journal of Clinical Virology**, v. 59, n. 1, p. 74-76, 2014.
- LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and infection**, v. 3, n. 13, p. 1145-1156, 2001.
- MARTELLA, V., BÁNYAI, K., MATTHIJNSSENS, J., BUONAVOGLIA, C., & CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3, p. 246-255, 2010.
- MATSUNO, S., HASEGAWA, A., KALICA, A. R., & KONO, R. Isolation of a recombinant between simian and bovine rotaviruses. **The Journal of general virology**, v. 48, n. 1, p. 253-256, 1980.
- MATTHIJNSSENS, J., CIARLET, M., MCDONALD, S. M., ATTOUI, H., BÁNYAI, K., BRISTER, J. R., VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of virology**, v. 156, n. 8, p. 1397-1413, 2011.
- MEBUS, C. A., UNDERDAHL, N. R., RHODES, M. B., & TWIEHAUS, M. J. **Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak**. University of Nebraska, College of Agriculture and Home Economics, Agricultural Experiment Station, 1969.
- MÉDICI, K. Rotavírus grupos A, B e C em leitões lactentes: Frequência de diagnóstico e avaliação molecular de rotavírus atípicos. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência animal (Sanidade Animal), Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2007.
- MIDGLEY, S. E., BÁNYAI, K., BUESA, J., HALAIHEL, N., HJULSAGER, C. K., JAKAB, F., BÖTTIGER, B. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. **Veterinary microbiology**, v. 156, n. 3, p. 238-245, 2012.
- MORES, N., SOBESTIANSKY, J., WENTZ, I., ROWE, C. A., & MARQUES, J. L. L. Rotavírose suína: descrição em um surto. **EMBRAPA-CNPSA**, 1987.
- NAKAGOMI, O., MOCHIZUKI, M., ABOUDY, Y., SHIF, I., SILBERSTEIN, I., & NAKAGOMI, T. Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for transmission of animal rotaviruses to humans. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 4, p. 1011-1013, 1992.
- NAKATA, S., PETRIE, B. L., CALOMENI, E. P., & ESTES, M. K. Electron microscopy procedure influences detection of rotaviruses. **Journal of clinical microbiology**, v. 25, n. 10, p. 1902-1906,



1987.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Fundamentos de medicina interna de pequenos animais. Ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2009.

PHAN, T. G., OKITSU, S., MANEEKARN, N., & USHIJIMA, H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 5, p. 656-663, 2007.

PRASAD, B. V., BURNS, J. W., MARIETTA, E., ESTES, M. K., CHIU, W. Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. 1990.

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, R. M. C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2233-2242, 2009.

SAIF, L. J. Reoviridae. In: Fenner's Veterinary Virology. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, 4 ed; p. 276-290. 2011.

SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SANEKATA, T.; YOSHIDA, Y.; OKADA, H. Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination. **Journal of immunological methods**, v. 41, n. 3, p. 377-385, 1981.

SCHMITTGEN, T. D., ZAKRAJSEK, B. A., MILLS, A. G., GORN, V., SINGER, M. J., REED, M. W. Quantitative Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction to Study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time Methods<sup>1</sup>. **Analytical Biochemistry**, v. 285, p. 194-204, 2000.

SIEG, M., RÜCKNER, A., KÖHLER, C., BURGNER, I., & VAHLENKAMP, T. W. A bovine G8P [1] group A rotavirus isolated from an asymptotically infected dog. **Journal of General Virology**, v. 96, n. Pt 1, p. 106-114, 2015.

SILVA, M. Rotavírus A genótipos G5 e G1 associados ao genótipo P[8] circulando no Brasil de 1986 a 2013: variabilidade genética pré e pós-vacinação. Tese (Doutorado). Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2014.



SOARES, L. Análise molecular dos genes VP4, VP7 e NSP4 de rotavírus do tipo G1 circulantes em Belém e Marituba, Pará, Brasil, de 1982 a 2008. Tese (Doutorado). Programa de pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2011.

STIPP, D. Rotavírus suíno grupo C (PoRV-C): Análise filogenética do gene VP6 de estirpes virais brasileiras e diagnóstico molecular de infecções singulares e mistas (PoRV-A e PoRV-B) em um surto de diarreia em leitões lactentes. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência animal ( Sanidade Animal), Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2011.

TAYLOR, S., WAKEM, M., DIJKMAN, G., ALSARRAJ, M., NGUYEN, M. A practical approach to RT-qPCR—publishing data that conform to the MIQE guidelines. **Methods**, v. 50, n. 4, p. S1-S5, 2010.

WALKER, C. L. F., RUDAN, I., LIU, L., NAIR, H., THEODORATOU, E., BHUTTA, Z. A., BLACK, R. E. Global burden of childhood pneumonia and diarrhoea. **The Lancet**, v. 381, n. 9875, p. 1405-1416, 2013.

ZHANG, M., ZENG, C. Q. Y., MORRIS, A. P., ESTES, M. K. A functional NSP4 enterotoxin peptide secreted from rotavirus-infected cells. **Journal of virology**, v. 74, n. 24, p. 11663-11670, 2000.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Rotavirus Information and Surveillance Bulletin. In: volume 4 - October 2011, reporting period: January to December 2010. Disponível em [http://www.who.int/immunization/sage/3\\_Final\\_RV\\_bulletin\\_Jan\\_Dec\\_2010\\_Data\\_nov11.pdf](http://www.who.int/immunization/sage/3_Final_RV_bulletin_Jan_Dec_2010_Data_nov11.pdf), acessado em 15 de maio de 2015.