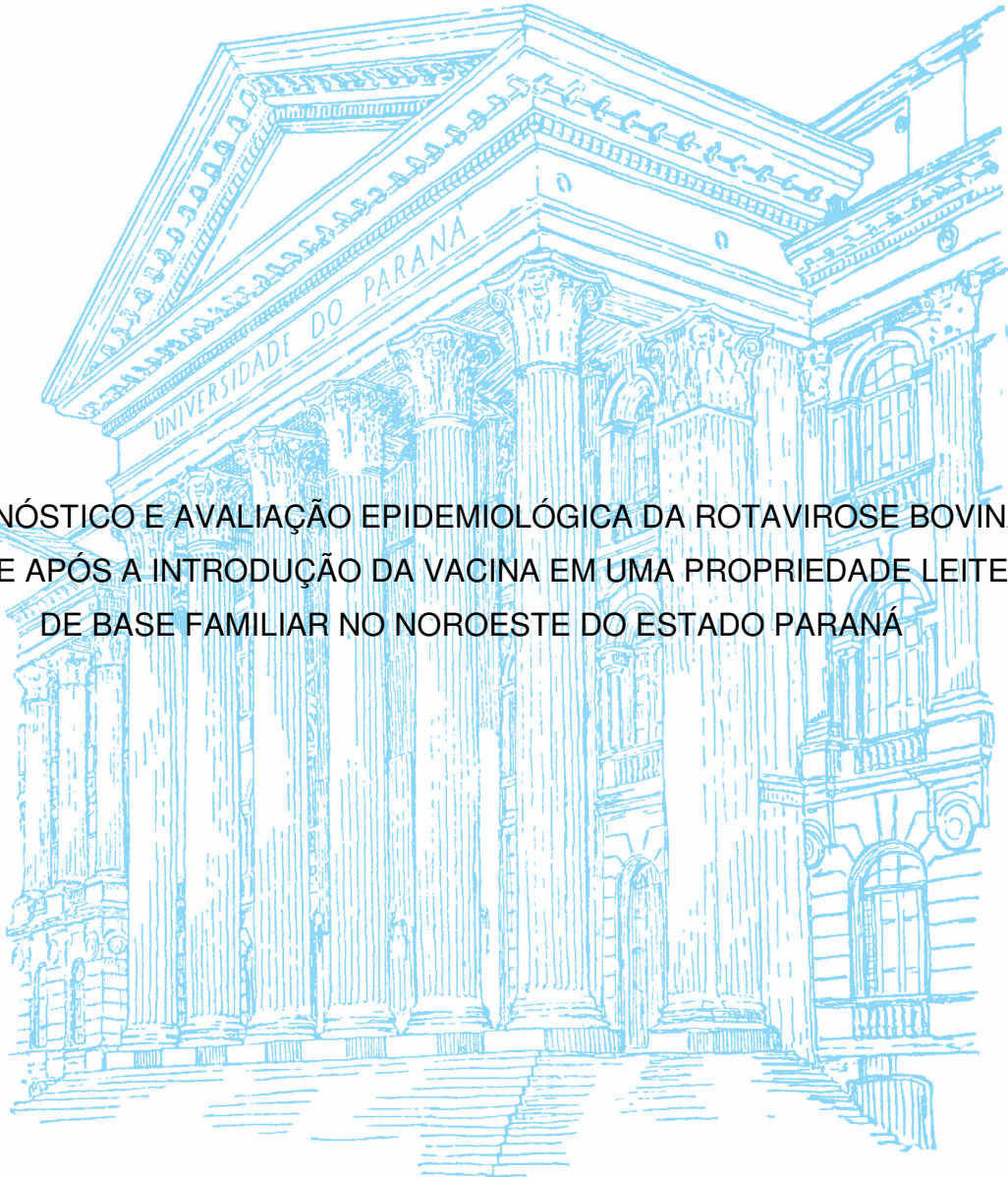


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ DE SÁ RIBEIRO

DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA ROTAVIROSE BOVINA  
ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DA VACINA EM UMA PROPRIEDADE LEITEIRA  
DE BASE FAMILIAR NO NOROESTE DO ESTADO PARANÁ



PALOTINA

2014

ANDRÉ DE SÁ RIBEIRO

DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA ROTAVIROSE BOVINA  
ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DA VACINA EM UMA PROPRIEDADE LEITEIRA  
DE BASE FAMILIAR NO NOROESTE DO ESTADO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Elisabete Takiuchi

PALOTINA

2014

## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



## TERMO DE APROVAÇÃO

ANDRÉ DE SÁ RIBEIRO

DIAGNÓSTICO E AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA ROTAVIROSE BOVINA ANTES E APÓS A INTRODUÇÃO DA VACINA EM REBANHO LEITEIRO NO NOROESTE DO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, Área de Concentração em Saúde Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Prof.ª Dr.ª Elisabete Takiuchi

Presidente/Orientador(a): Universidade Federal do Paraná

Prof.ª Dr.ª Sheila Rezler Wosiacki

Membro: Universidade Estadual de Maringá

Prof.ª Dra. Sílvia Cristina Osaki

Membro: Universidade Federal do Paraná

Palotina, 15 de agosto de 2014.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

André de Sá Ribeiro, filho de Antônio Pedro Ribeiro e Terezinha de Sá Ribeiro. Natural de Curitiba-PR, nascido aos nove dias do mês de maio em 1987. Médico Veterinário formado no ano de 2010 pela Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina. Servidor público municipal na cidade de Mariluz-PR desde Abril de 2010, onde trabalha na Secretaria da Agricultura e Meio Ambiente como Médico Veterinário. Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina na área de Microbiologia aplicada à Produção Animal.

## EPÍGRAFE

"Minha expectativa, tantas vezes ansiosa,  
de que as coisas sejam diferentes,  
dá lugar à certeza tranquila de que,  
neste momento, tudo está onde pode estar.  
Em vez de sofrer pelas modificações que ainda não  
consigo, eu me sinto grato pelas mudanças que já  
realizei.  
E relaxo."  
Fernando Callejón

## DEDICATÓRIA

A Deus  
Aos meus pais Antônio Pedro Ribeiro e Terezinha de Sá Ribeiro

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela oportunidade de estar aqui hoje em constante aprendizado e aprimoramento, por sua sabedoria e misericórdia.

À minha família, por ter me proporcionado todo apoio e condição em toda a minha caminhada e acreditarem em mim. Em especial meu pai Antônio e minha mãe Terezinha, por me ensinarem a ser um homem de carácter e princípios, sempre confiante em Deus.

À minha irmã, Mariana, pelo exemplo de força, determinação e pelos conselhos ao longo da minha carreira profissional.

Ao meu sobrinho Pedro Henrique, que me lembra como é bom ser criança, e me proporciona sempre momentos de diversão.

Aos irmãos de república da V.L. durante a graduação Jorge, Patrick, Rafael Rovaris, Fábio Soto, Paulo Sanches, que sempre posso contar com a ajuda.

Aos amigos de graduação e aos que também se tornaram amigos de pós-graduação como Gustavo Triques, Thiago Vinholi, Cibeli Viana.

Aos amigos de república da Toca do Lagarto durante a pós-graduação Daltinho, Andrei, Wagner, Renan e Edvaldo que me receberam como hóspede e foram verdadeiros companheiros.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente a minha companheira de orientação, Rúbia, que sempre esteve disposta e ajudou na realização do projeto.

Aos novos amigos Fabinho, Nelsão, Fabiano e Diego, que abriram as portas da propriedade e aceitaram esse desafio do projeto ao longo de quase dois anos, que foi com toda a certeza fundamental para o bom andamento do projeto.

Ao Prefeito de Mariluz, Paulinho Alves, por permitir e apoiar meus estudos.

Ao Instituto Tecnológico SIMEPAR, por ter disponibilizado os dados meteorológicos incluídos no estudo.

Ao Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, por ter auxiliado nas análises genotípicas do estudo.

À Zoetis, por disponibilizar o material para o estudo, e seu funcionário, Pablo, que acompanhou e ajudou na pesquisa.

Aos colegas e amigos de laboratório (LABIOTEC), Andressa, Jéssica e Janaína, obrigado pela companhia e pelo auxílio em diversas ocasiões; e por toda a contribuição e tempo dedicados ao projeto.

À professora Dra. Sheila Rezler Wosiacki, por ter aceitado o convite para participar da banca.

À professora Dra. Silvia Cristina Osaki por ter aceitado o convite para participar da banca e pela contribuição acadêmica na disciplina ofertada.

À professora Dra. Elisabete Takiuchi, pela orientação no mestrado e por ser sempre acolhedora e motivadora, demonstrando sempre a confiança no projeto e sendo uma excelente profissional e amiga ao longo da orientação, tenho a certeza que não poderia ter escolhido uma orientadora melhor.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela formação acadêmica.

A todos que contribuíram para a realização deste sonho. Muito Obrigado.



RIBEIRO, A. S. **Diagnóstico e avaliação epidemiológica da rotavirose bovina antes e após a introdução da vacina em uma propriedade leiteira de base familiar no noroeste do paraná.** 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal; Área de Concentração: Saúde Animal; Linha de Pesquisa: Microbiologia aplicada à produção animal) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Palotina. 2014.

## RESUMO

A diarreia neonatal é considerada o principal problema sanitário na criação de bezerros de rebanhos de corte e de leite em todo o mundo e é responsável por grandes prejuízos econômicos. Sua etiologia é bastante complexa e envolve múltiplos fatores predisponentes e determinantes. O Rotavírus A é a principal etiologia viral de focos de diarreia em bezerros em todo o mundo, com maior frequência de diagnóstico em animais com até 60 dias de idade. Dada a efetiva representação das propriedades familiares na produção de leite no estado do Paraná, torna-se imprescindível estudos epidemiológicos que investiguem a participação deletéria do RVA para a condução e avaliação de medidas profiláticas. O presente trabalho realizou o diagnóstico e avaliação epidemiológica da rotavirose bovina, antes e após a introdução da vacinação materna em uma propriedade leiteira de base familiar localizada no município de Mariluz, Paraná. Os resultados obtidos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) foram também comparados a outros fatores, como idade dos animais, paridade das vacas, parâmetros meteorológicos e caracterização molecular das amostras positivas. A morbidade de RVA apresentou um aumento entre os grupos antes da vacinação (39%) e o com vacinação completa (48%). As taxas de mortalidade específica e letalidade diminuíram 8% e 22% respectivamente, porém não foram significativas. A frequência de detecção do RVA foi significativamente maior nos animais com 7 dias de idade ( $P < 0,05$ ). A paridade (primíparas e multíparas) das fêmeas não constitui fator determinante para a ocorrência do RV-A. Ao longo das estações do ano o RVA apresentou uma maior prevalência durante a primavera e a menor prevalência no inverno. A genotipagem identificou a circulação de RVA genótipos G6, G10, P[5] e P[11] e as combinações G10P[11] e G6P[5]. Os resultados preliminares sugeriram que a vacinação materna não protegeu os bezerros da infecção por RVA homólogo (G10).

**Palavras-Chave:** bezerros, diarreia, rotavírus, vacinação

**RIBEIRO, A. S. DIAGNOSIS AND EPIDEMIOLOGICAL EVALUATION OF BOVINE ROTAVIRUS BEFORE AND AFTER THE VACCINE INTRODUCTION IN A FAMILY BASED DAIRY PROPERTY IN NORTHWEST PARANÁ. 2014.**

**ABSTRACT**

Neonatal diarrhea is considered a major health problem in raising beef cattle herds and dairy herds worldwide and is responsible for major economic losses. Its etiology is complex and involves multiple predisposing and determinant factors. Rotavirus A is the main viral etiology of outbreaks of diarrhea in calves in the world, diagnostic most frequently in animals until 60 days old. Given the effective representation of family properties in milk production in Paraná state, epidemiological studies investigating the deleterious participation of the RVA for the conduct and evaluation of prophylactic measures are essential. This paper constitutes the diagnosis and epidemiological evaluation of the bovine rotaviruses before and after the maternal vaccination introduction in a family based dairy property in the city of Mariluz, Paraná. The results obtained by the technique of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) were also compared to other factors such as age of the animals, parity cows, meteorological parameters and molecular characterization of positive samples. The morbidity of RVA showed an increase between groups before vaccination (39%) and fully vaccinated (48%). The rates of specific mortality and lethality decreased by 8% and 22% respectively, but were not significant. The frequency of detection of the RVA was significantly higher in animals with 7 days old ( $P < 0.05$ ). The parity (primiparous and multiparous) of the females is not a determining factor for the occurrence of RV-A. Throughout the seasons, RVA showed a higher prevalence during the spring and lowest prevalence in winter. Genotyping identified the circulation RVA genotypes G6, G10, P [5] and P [11] and G10P [11] and G6P [5] combinations. Preliminary results suggested that maternal vaccination does not protect calves from infection with homologous RVA (G10).

**Keywords:** calves, diarrhea, rotavirus, vaccination.

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADRV-N	- <i>new adult diarrhea rotavirus</i> (novo rotavírus de diarreia em adultos)
BCoV	- coronavírus bovino
BoRV-A	- rotavírus bovino A
DERAL	- Departamento Econômico Rural do Paraná
EGPA	- Eletroforese em gel de poliacrilamida
Ig	- Imunoglobulina
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	- <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus)
NCDV - Lincoln	- <i>neonatal calf diarrhea virus</i> (vírus da diarreia neonatal em bezerros)
NSP	- <i>non structural protein</i> (proteína não-estrutural)
OD	- <i>Odds Ratio</i>
PCR	- <i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
RR	- Risco Relativo
RT	- <i>reverse transcription</i> (transcrição reversa)
RV	- rotavírus
SEAB	- Secretaria da Agricultura e do Abastecimento
VP	- <i>viral protein</i> (proteína viral)

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Indicadores epidemiológicos da população de bezerros com até 30 dias de idade na propriedade de Mariluz, Paraná (maio de 2012 a janeiro de 2013). .....	31
Tabela 2.	Distribuição das fêmeas avaliadas de acordo com a categoria (paridade) na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná.....	34
Tabela 3.	Distribuição das fêmeas gestantes e o protocolo de primovacinação empregado na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná.....	34
Tabela 4.	Distribuição do número de amostras de fezes coletadas de acordo com a idade do animal em dias.....	35
Tabela 5.	Números absolutos de animais nascidos, positivos para RV, óbitos (diarreia) e óbitos (RV positivos) nos períodos de estudo antes e após a introdução da vacina na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná. ....	40
Tabela 6.	Indicadores epidemiológicos de morbidade de RV, mortalidade geral, mortalidade específica e letalidade na população de bezerros com até 30 dias de idade, nos períodos de estudo antes e após a introdução vacinação materna contra rotavirose na propriedade de Mariluz, Paraná. ....	40
Tabela 7.	Indicadores epidemiológicos de morbidade de RV, mortalidade geral, mortalidade específica e letalidade na população de bezerros com até 30 dias de idade, nos períodos de estudo antes e após a introdução da vacinação materna sob diferentes protocolos de imunização na propriedade de Mariluz, Paraná. ....	41
Tabela 8.	Distribuição de resultados positivos e negativos para RV por EGPA nas amostras de fezes de animais nascidos conforme o protocolo da primovacinação nas fêmeas gestantes da propriedade de Mariluz, Paraná (março de 2013 a fevereiro de 2014). ....	42
Tabela 9.	Distribuição da frequência de diagnóstico positivo para RV pela EGPA e indicadores epidemiológicos em relação aos protocolos de primovacinação realizados nas fêmeas gestantes da propriedade de Mariluz, Paraná (maio de 2013 a fevereiro de 2014). ....	42
Tabela 10.	Frequência de diagnóstico de RV por EGPA de acordo com a paridade das fêmeas gestantes na propriedade de Mariluz, Paraná (março de 2013 a fevereiro de 2014).....	43
Tabela 11.	Distribuição da frequência de diagnóstico de RV por EGPA, de acordo com a idade dos animais da propriedade de Mariluz, Paraná (março de 2013 a fevereiro de 2014).....	43
Tabela 12.	Distribuição da frequência de diagnóstico para RV pela EGPA e indicadores epidemiológicos em relação à idade dos animais na propriedade de Mariluz, Paraná (maio de 2013 a fevereiro de 2014).....	44
Tabela 13.	Comparação entre as médias dos indicadores climáticos dos meses de Setembro e Outubro com as média dos seis dias que antecederam o início do surto. ....	48
Tabela 14.	Características dos animais envolvidos no surto de rotavirose bovina na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná (04 a 16 de outubro de 2013).....	49
Tabela 15.	Genótipos G[P] de RVA detectados nas fezes de bezerros da propriedade de Mariluz, Paraná (2012-2013).....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Eletoforese 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 (direita abaixo).....	18
Figura 2.	Criação de bezerros em piquetes e baias coletivas.....	29
Figura 3.	Animais de diferentes faixas etárias mantidos em piquete coletivo.....	30
Figura 4.	Bezerros letárgicos acometidos pela diarreia. ....	32
Figura 5.	Bezerro morto após apresentar diarreia.....	32
Figura 6.	Aplicação da vacina ScourGuard 4KC em uma vaca gestante, por via intramuscular na região do pescoço.....	33
Figura 7.	Coleta de fezes diretamente da ampola retal.....	35
Figura 8.	Eletoforese em gel de poliacrilamida seguida pela coloração por nitrato de prata de ácidos nucleicos extraídos de amostras fecais de bezerros da propriedade de Mariluz, Paraná (maio de 2013 a janeiro de 2014). Canaletas 1, 2, 3, 6, 10, 14: amostras positivas com perfil de migração característico do RVA (perfil 4-2-3-2); 4, 5, 7-9, 11-13, 16: amostras negativas; 17: controle positivo de RVA.....	39
Figura 9.	Distribuição da frequência de diagnóstico de rotavírus grupo A (n=33) por estações do ano, de acordo com as variáveis climáticas. (março de 2013 a fevereiro de 2014). Painel A: Média da temperatura mínima (°C); Painel B: Média da precipitação pluviométrica (mm). Painel C: Média da umidade relativa do ar (%). Dados do Serviço de Informação Meteorológica do Estado do Paraná (SIMEPAR) estação de Umuarama.....	45
Figura 10.	Distribuição mensal de amostras coletadas e resultados positivos para RV de acordo com as médias dos indicadores climáticos. Painel A: temperatura mínima (°C); Painel B: precipitação pluviométrica (mm); Painel C: umidade relativa do ar (%) (março de 2013 a fevereiro de 2014).....	46
Figura 11.	Distribuição da frequência mensal de diagnóstico de rotavírus (%) de acordo com as variáveis meteorológicas: Média da temperatura mínima (°C); Média da umidade relativa do ar (%); Média do índice pluviométrico (mm). (março de 2013 a fevereiro de 2014). ....	47
Figura 12.	Distribuição diária da precipitação pluviométrica, temperatura média e umidade relativa do ar dos meses de setembro e outubro de 2013. ....	49

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 Diarreia neonatal bovina .....	16
2.2 Rotavírus (RV) .....	17
2.3 Rotavírus A (RVA) .....	19
2.4 Rotavírus Bovino A (BoRVA) .....	19
2.5 Epidemiologia .....	21
2.6 Diagnóstico laboratorial .....	23
2.7 Prevenção e Controle .....	24
2.8 Falhas vacinais .....	26
3 OBJETIVOS .....	28
3.1 Objetivo geral .....	28
3.2 Objetivos específicos .....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1 Localização e descrição do local de estudo .....	29
4.2 Caracterização preliminar do problema e indicadores epidemiológicos .....	30
4.3 Vacina e vacinação .....	33
4.4 Amostras fecais .....	34
4.5 Extração bruta das fezes .....	36
4.6 Extração do ácido nucleico viral .....	36
4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do rotavírus bovino (EGPA) .....	36
4.8 Análise estatística .....	37
4.9 Rotavírus e fatores climáticos .....	37
4.10 Genotipagem de RV .....	37
5 RESULTADOS .....	39
6 DISCUSSÃO .....	51
7 CONCLUSÕES .....	59
8 REFERÊNCIAS .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva do leite vem se destacando de forma significativa no agronegócio brasileiro com taxas crescentes da produção leiteira nos últimos vinte anos. Segundo os dados mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil produziu no ano de 2012, 32,3 bilhões de litros de leite, ocupando a quarta posição no ranking dos maiores produtores de leite do mundo daquele ano. Deste total, 69,1% da produção são representativos das regiões Sul e Sudeste. Entre os estados da Federação, a maior produção leiteira ocorreu em Minas Gerais com 27,6%, seguido pelos estados do Rio Grande do Sul (12,5%), Paraná (12,3%) e Goiás (11,0%).

Além disso, a produção leiteira no Brasil sempre esteve associada ao desenvolvimento da Agricultura Familiar. Atualmente, aproximadamente 84% das propriedades rurais são de base familiar, somando mais de quatro milhões de famílias em que a pecuária leiteira está presente, gerando cerca de 58% do leite brasileiro (IBGE, 2006; DIEESE, 2011). No Paraná, as propriedades de leite familiares representam 38,8% das propriedades e são responsáveis por 44% da produção de leite (IPARDES, 2009).

É notório que os ganhos de produtividade são resultados da adoção de tecnologias que melhoraram a eficiência do uso dos fatores de produção. Entre eles estão os melhoramentos na genética dos rebanhos com aptidão leiteira, na nutrição animal e no manejo. Entretanto apesar da evolução nesses setores, a saúde animal, no que diz respeito ao aspecto sanitário dos rebanhos não teve a mesma evolução. A constante exposição dos animais a uma variedade de enfermidades agudas e crônicas afetam direta ou indiretamente a produção animal, o bem estar e a sanidade do rebanho (WILSON et al., 2005).

Dentre as diarreias infecciosas de etiologia viral, as infecções determinadas pelos rotavírus são reconhecidamente uma das principais causas de perdas econômicas no período entre o nascimento e o desmame devido ao atraso de crescimento, nascimento de bezerros fracos e altas taxas de mortalidade nos rebanhos. Levantamentos epidemiológicos realizados nos EUA, Canadá, Índia, Austrália e vários países europeus, indicam que o rotavírus é responsável por taxas de morbidade que podem variar de 8 a 36% e de mortalidade de 3 a 6%

(REINHARDT et al., 1986; MOORE, 1989; HUANG et al., 1992; LUCCHELLI et al., 1992; GARCIA-SANCHEZ et al., 1993).

No Brasil, os estudos epidemiológicos envolvendo a rotavirose bovina estão mais relacionados com a frequência de diagnóstico e os fatores de risco envolvidos. (BARBOSA et al., 1988; BRITO et al., 1994; BUZINARO et al., 2000; JEREZ et al., 2002; ALFIERI et al., 2006; BRANDÃO et al., 2007; STIPP et al., 2009; FREITAS et al., 2011). Entretanto são ainda inexistentes estudos epidemiológicos de acompanhamento sistemático de populações bovinas para avaliações de morbidade e mortalidade decorrentes de infecções pelo rotavírus bovino, bem como sua caracterização molecular.

O uso de vacinas para o controle das rotaviroses ainda é pouco comum, e constitui uma das poucas ferramentas contra a enfermidade, entretanto sua eficácia possui variações, sendo muitas vezes relacionadas à variabilidade antigênica dos rotavírus circulantes. No Brasil ainda são escassos estudos epidemiológicos sobre o impacto da vacinação sobre os índices de morbidade e mortalidade em situações de desafio a campo.

Dada a importância da pecuária leiteira para a agricultura familiar, bem como dos prejuízos econômicos ocasionados pelo rotavírus bovino, o objetivo deste trabalho foi realizar uma avaliação epidemiológica da rotavirose bovina em uma propriedade produtora de leite de regime familiar localizada no município de Mariluz, Região Noroeste do Estado do Paraná.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Diarreia neonatal bovina

A diarreia neonatal é o principal problema sanitário na criação de bezerros de rebanhos de corte e de leite em todo o mundo e é responsável por grandes prejuízos econômicos à bovinocultura. As consequências mais frequentes dos episódios de diarreia neonatal bovina são os aumentos significativos nas taxas de morbidade e mortalidade, maior susceptibilidade a outras infecções, particularmente as respiratórias, despesas adicionais com o tratamento dos animais acometidos, redução na conversão alimentar e atraso no crescimento (PAUL e LYOO, 1993). Estudos recentes continuam demonstrando que a diarreia constitui a principal causa de mortalidade de bezerros nos primeiros meses de vida (AZIZZADEH et al., 2011; TORSEIN et al., 2011; MOHD NOR et al., 2012).

Em relação aos animais sobreviventes, os prejuízos podem se estender até a vida adulta, decorrente do retardo no crescimento e nas fêmeas pelo atraso substancial da idade ao primeiro parto (DONOVAN et al., 1998; MOHD NOR et al., 2012).

Não há dados que mostrem exatamente qual a participação das diarreias neonatais nos prejuízos de uma propriedade, porém estima-se que as perdas variam entre 20% e 52% em propriedade leiteiras, podendo gerar um custo equivalente a US\$ 33,46 bezerro/ano (BACHMANN, 1977; MORTEO et al., 1990; KANEENE e HURD, 1990). Em uma estimativa de custo de produção em sistemas de criação de bezerras leiteiras realizada na Holanda, a diarreia é apontada como uma das principais causas de perdas econômicas podendo gerar um custo adicional médio, caso o animal não venha a morrer, de € 95,00 por novilha (MOHD NOR et al., 2012).

A etiologia da diarreia neonatal em animais de produção é bastante complexa e envolve múltiplos fatores predisponentes e determinantes. Os fatores predisponentes de origem não infecciosa são principalmente atribuídos às falhas no manejo zootécnico-sanitário do rebanho, podendo ser de ordem ambiental, nutricional e relacionado ao manejo inadequado do colostro, bem como a idade do animal e seu estado imune. Entre os fatores determinantes de diarreia há uma

variedade de enteropatógenos como bactérias, parasitas, protozoários e vírus, que podem atuar de forma isolada ou em associação, comprometendo ainda mais a gravidade do quadro clínico (SNODGRASS et al., 1986; JANKE, 1989; BARTELS et al, 2010).

Destes enteropatógenos, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium sp*, coronavírus bovino e rotavírus bovino tem sido identificados em 75 a 95% dos casos de infecções intestinais em bezerros neonatos (ACRES, 1985; TZIPORI, 1985). A enfermidade clínica se desenvolve devido a uma relação desfavorável entre a resistência do bezerro e a pressão infecciosa desses agentes. (LORENZ; FAGAN e MORE, 2011).

## 2.2 Rotavírus (RV)

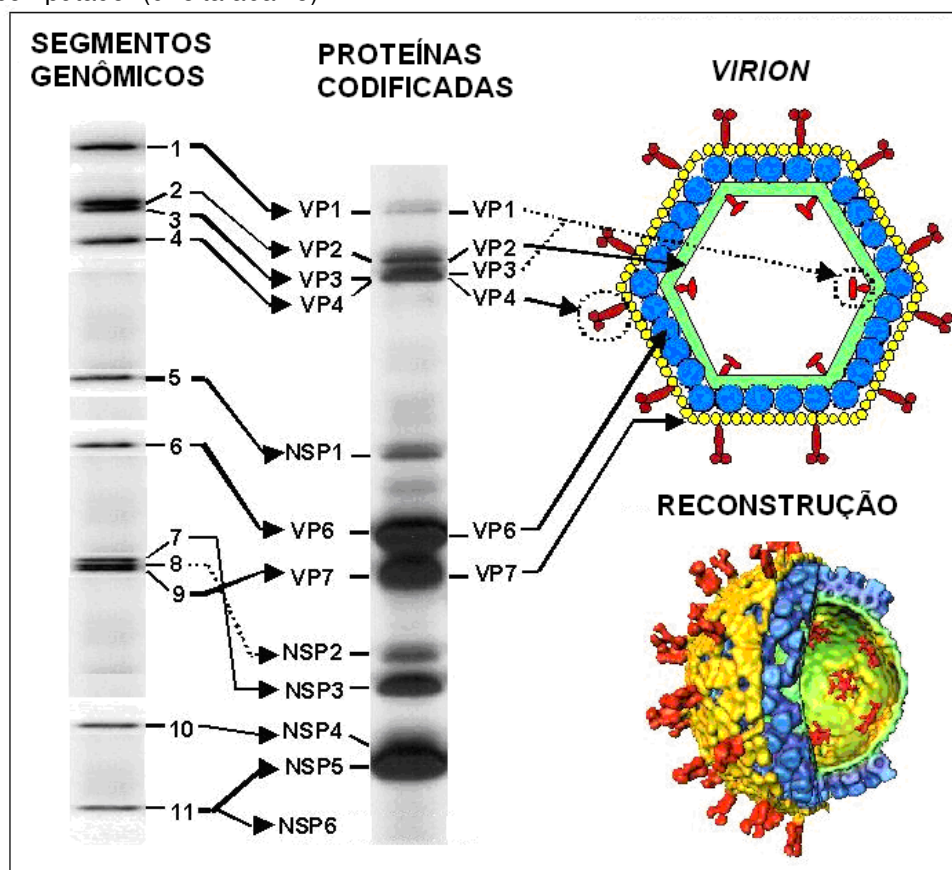
Em relação aos agentes etiológicos virais, o rotavírus é considerado em todo o mundo a principal causa de diarreia em mamíferos e aves. O rotavírus pertence à família Reoviridae, subfamília Sedoreoviridae, gênero Rotavírus (ALFIERI et al., 2007; ICTV, 2012). O Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) reconhece cinco espécies de rotavírus (RV) denominadas de Rotavirus A, B, C, D e E, e três espécies estão em fase de reconhecimento para validação taxonômica, nomeadas Rotavírus F, G e H. Na literatura, as espécies de RV também são comumente referenciadas como grupos de RV (MATTHIJNSSENS et al., 2012).

A partícula viral do rotavírus possui aproximadamente 70-90 nm de diâmetro e não possui envelope glicoproteico. Apresentam um triplo capsídeo, formado por três camadas proteicas concêntricas e de simetria icosaédrica, designadas de capsídeo externo, intermediário e interno (core) que envolve o genoma viral constituído por uma molécula de RNA de fita dupla (RNA fd) com 11 segmentos genômicos (DESSELBERGER, 1989; PRASAD e CHIU, 1994; ESTES; 1996).

Cada segmento genômico do RV regula a síntese de pelo menos uma proteína estrutural (VP de Viral Protein) ou não estrutural (NSP de Non Structural Protein) do vírus. As proteínas VP1, VP2 e VP3 constituem o capsídeo interno, das quais VP1 e VP3 estão diretamente associadas ao genoma viral. O capsídeo intermediário é formado pela proteína VP6 e o externo pelas proteínas VP4 e VP7. As seis NSP do RV (NSP1 a NSP6) estão envolvidas nos processos de replicação,

morfogênese e evasão da resposta imune do hospedeiro. A Figura 1 representa a estrutura do RV, os segmentos genômicos e as proteínas (VP e NSP) codificadas por cada segmento (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

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 (direita abaixo).



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

Nota: Segmentos numerados baseados na migração do genoma de rotavírus A da estirpe protótipo símia SA11.

Tradicionalmente, a classificação dos RV em espécies é fundamentada nos aspectos clínicos, morfológicos e principalmente pelas características antigênicas de VP6 das diferentes estirpes virais, por meio da utilização de antissoros específicos nos ensaios de imunofluorescência indireta (PEDLEY et al., 1986; MATTHIJNSSENS et al., 2012). Todos os genes dos RV são reconhecidos como antígenos pelo sistema imune, porém as proteínas VP4, VP6 e VP7 constituem os

principais sítios antigênicos, induzindo a produção de anticorpos neutralizantes (KAPIKIAN, 1994).

RVA, RVB e RVC são conhecidos por determinar infecções tanto em humanos quanto nos animais, enquanto que RVD, RVE, RVF e RVG são capazes de infectar apenas os animais (ESTES e KAPIKIAN, 2007). Em 1997, um novo RV foi descoberto infectando humanos adultos, recebendo a denominação prévia de *new adult diarrhea rotavirus* (ADRV-N) e com a recente descoberta de um vírus relacionado em suínos (WAKUDA et al., 2011), tem sido proposto o reconhecimento da nova espécie RVH (MATTHIJNSSENS et al., 2012; MOLINARI et al., 2014).

### 2.3 Rotavírus A (RVA)

Epidemiologicamente o RVA é considerado o mais importante enteropatógeno causador de diarreias em humanos e animais. Com base na diversidade antigênica das proteínas VP4 e VP7, localizadas no capsídeo externo, é comum a classificação genotípica dos RVA por um sistema binário (KAPIKIAN; HOSHINO e CHANOCK, 2001). Para a classificação genotípica a partir da VP7, por esta ser uma Glicoproteína, é utilizado o termo genotipo G ou simplesmente G tipo. Para a classificação a partir de VP4, por ser uma proteína sensível a Protease, é atribuído o termo genotipo P ou P tipo (ESTES e KAPIKIAN, 2007). Desta forma, por meio de técnicas sorológicas e/ou moleculares já foram descritos 35 diferentes tipos de P e 27 tipos de G (MATTHIJNSSENS et al., 2011). Essa diversidade de G e P tipos permite inúmeras combinações possíveis, mas algumas são mais frequentes de acordo com a espécie animal infectada. Para referenciar os diferentes genotipos G e P utiliza-se o sistema de nomenclatura binário GxP[y], sendo x o número do genotipo G, e o y entre colchetes representa o número do genotipo P.

Recentemente, um novo sistema de classificação para os RV foi proposto o qual recomenda o sequenciamento completo ou parcial de todos os 11 segmentos genômicos para uma melhor compreensão das relações evolucionárias entre as espécies (MATTHIJNSSENS et al., 2011).

### 2.4 Rotavírus Bovino A (BoRVA)

O BoRVA é a principal etiologia viral de focos de diarreia em bezerros em todo o mundo, tendo a maior frequência de diagnóstico em animais com até 60 dias de idade (ISHIZAKI et al., 1996; LUCHELLI et al., 1992; VENDE et al., 1999; GAY et al., 2012).

O vírus é transmitido aos animais susceptíveis pela via fecal-oral pelo contato direto com bezerros infectados ou indireto, por meio de objetos, alimentos e água contaminados com os excrementos do animal infectado. Na fase aguda da infecção, os animais podem eliminar aproximadamente  $10^{12}$  partículas virais por grama de fezes. A grande quantidade de vírus excretada associada à alta estabilidade do RV frente a diversos fatores ambientais favorece a transmissibilidade destes vírus, perpetuando o ciclo de infecção dentro das propriedades (BRIDGER, 1994).

No organismo do hospedeiro, o vírus resiste ao pH estomacal e alcança a luz intestinal. O RV possui tropismo pelas células do intestino delgado, onde penetram pela membrana celular dos enterócitos maduros localizados na região apical das vilosidades intestinais do duodeno e porção anterior do jejuno. Além da capacidade absorptiva, os enterócitos maduros ou do ápice das vilosidades, desempenham uma função digestiva com a secreção da enzima lactase. A partir deste momento é iniciado o ciclo replicativo no interior dos enterócitos, culminando na lise e descamação do epitélio intestinal e os vírus liberados após a descamação irão infectar novos enterócitos adjacentes. O vírus é excretado nas fezes por até sete a oito dias pós-infecção. Em decorrência da grande injúria tecidual, a reposição celular é feita por células cubóides, imaturas morfológica e fisiologicamente, provenientes das criptas intestinais que não são afetadas diretamente pelos RV. Embora as células imaturas sejam refratárias a uma nova infecção viral, o que caracteriza a infecção como auto-limitante, elas perdem suas capacidades absorptiva e digestiva (ESTES, 2001; MURPHY et al., 1999).

Baseado nos mecanismos fisiopatológicos, a diarreia ocasionada pelo RV também é dita como diarreia por má absorção. Além disso, por deficiência da secreção da enzima lactase, ocorre falha na degradação da lactose. Associada à má absorção, o acúmulo da lactose não digerida sofre fermentação por ação das bactérias, intensificando a diarreia devido ao aumento da pressão osmótica na luz intestinal. Desta forma, as infecções por RV são frequentemente referenciadas como

“diarreias de curso branco”, devido à presença de leite não digerido nas fezes diarreicas. Perda de enterócitos maduros também contribui para uma insuficiência sistêmica de bicarbonato, sódio, potássio, cloreto e água, cursando com a acidose metabólica (ESTES, 2001; JAKOBSSON, 2013). Conseqüentemente à lesão provocada, os mediadores da reação inflamatória comprometem também as células da cripta sendo a motilidade intestinal inibida durante a maioria dos casos de diarreia. Quando o número de enterócitos infectados excede o da reposição celular, as vilosidades atrofiam-se, podendo fundir-se nos casos mais graves. Após um período de incubação médio de 16 a 24 horas aparecem os primeiros sinais de diarreia. Além da diarreia, outros sinais clínicos não-específicos das síndromes diarreicas incluem depressão, anorexia, desidratação, pelo eriçado, sinais inerentes à acidose metabólica e vômito. Animais jovens podem morrer em consequência da desidratação ou infecção bacteriana secundária, mas a maioria se recupera dentro de três a quatro dias (ESTES, 2001). A detecção de RV nas fezes de animais clinicamente saudáveis sugere a existência de portadores assintomáticos nos rebanhos que podem atuar como prováveis fontes de infecção para outros animais suscetíveis (FIJTMAN et al., 1987; LUCHELLI et al., 1992; BUZINARO et al., 2000).

A maior susceptibilidade dos animais neonatos é explicada pelo fato de que a reposição do epitélio apical das vilosidades ocorre de forma mais lenta, facilitando o desenvolvimento completo do ciclo viral e a geração de nova progênie. Os animais adultos tornam-se mais resistentes à doença porque a reposição de enterócitos é mais intensa e compete com a replicação viral, de forma que somente as amostras muito virulentas podem causar diarreia em bezerras acima de seis semanas de idade. A doença geralmente é rara durante a primeira semana de vida do animal, provavelmente devido à transmissão passiva dos anticorpos maternos e consequente neutralização do vírus (MURPHY et al., 1999).

## 2.5 Epidemiologia

Em bovinos, a diarreia causada pelos BoRVA é reconhecidamente uma das principais causas de perdas econômicas no período entre o nascimento e o desmame. Levantamentos epidemiológicos realizados nos EUA, Canadá, Índia, Austrália e vários países europeus indicam que o BoRVA é responsável por taxas de

morbidade que podem variar de 8 a 36% e de mortalidade de 3 a 6% (REINHARDT et al 1986; MOORE, 1989; HUANG et al., 1992; LUCHELLI et al., 1992). Estas perdas são mais expressivas em países em desenvolvimento, onde as condições socioeconômicas e ambientais subadequadas favorecem a sobrevivência do vírus no meio ambiente e conseqüentemente a transmissão do vírus (GHOSH et al., 2007). Na Argentina, as diarreias, particularmente de etiologia viral, são responsáveis por até 42% das perdas que ocorrem em bezerros ainda no primeiro mês de vida (MANZULLO, 1985). Em outro estudo realizado na Argentina, o BoRVA foi apontado como o agente etiológico de 62,5% (250/400) dos casos de diarreias em bezerros registrados num período de 10 anos (1994 a 2003) (GARAICOECHEA et al., 2006).

Na Austrália, o BoRV também foi o micro-organismo mais prevalente nos casos de diarreia neonatal em rebanhos de corte e leite, tendo sido identificado em 79,9% das 597 amostras analisadas, seguido pelo *Cryptosporidium parvum* (58,5%), *Salmonella spp.* (23,8%), coronavírus (21,6%) e *Escherichia coli* K99 (17,4%) (IZZO et al., 2011).

No Brasil, a rotavirose bovina já foi identificada em vários estados da federação como São Paulo, Paraná, Goiás, Mato Grosso e Minas Gerais (BARBOSA et al., 1988; BRITO et al., 1994; BUZINARO et al., 2000; JEREZ et al., 2002; ALFIERI et al., 2006). Nestes estudos, a porcentagem de amostras positivas para rotavírus bovino variou consideravelmente, entre 3 a 30%. Essas variações são influenciadas principalmente pelo método analítico utilizado para a detecção do vírus e características relacionadas à amostragem (tamanho da amostragem, período da coleta, condições de armazenagem, faixa etária dos animais). Entretanto, os dados relativos a prejuízos econômicos ou mesmo taxas de morbidade e mortalidade em bezerros, ocasionados pelo rotavírus bovino, ainda são bastante escassos no país. De acordo com Freitas et al. (2011), as altas prevalências encontradas em rebanhos leiteiros do Brasil estão diretamente relacionadas às condições dos sistemas de produção e manejo adotadas. A elevada contaminação ambiental, rebanhos com grande número de animais e manejo que favorece a transmissão do agente, associado a uma taxa de imunização inexpressiva constituem fatores favoráveis para a disseminação do vírus nos rebanhos.

Em relação aos genótipos G (VP7) e P (VP4) de BoRVA descritos, os G tipos frequentemente encontrados em amostras fecais de bezerros com diarreia são G6,

G8, G10, e os P tipos mais frequentes são P[1], P[5] e P[11]. Mesmo com vários genótipos diferentes de BoRVA existentes, algumas combinações de genes parecem ser mais prevalentes do que outras como por exemplo: G6P[1] (NCDV - Lincoln), G6P[5] (UK); G10P[11] (B223), G8P[1] (A5) (SNODGRASS et al., 1990; ISHIZAKI et al., 1996; FUKAI et al., 1999; FUKAI et al., 2002; OKADA e MASTUMOTO, 2002; ALFIERI et al., 2004; BARREIROS et al., 2004; GARAI COECHEA et al., 2006; REIDY et al., 2006; BUZINARO et al., 2009; SWIATEK et al., 2010; MIDGLEY et al., 2012).

## 2.6 Diagnóstico laboratorial

Considerando a semelhança dos sinais clínicos determinados por diferentes enteropatógenos, o diagnóstico definitivo das rotaviroses depende essencialmente da realização de testes laboratoriais. A grande quantidade de partículas virais excretadas no período agudo da infecção, associada ao aspecto segmentado do genoma do rotavírus, permite a aplicação da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) seguida pela coloração por nitrato de prata para a identificação destes vírus (BONADUCE, 1990). Os RV são os únicos agentes infecciosos conhecidos de mamíferos e aves que apresentam onze segmentos de RNA fita dupla. Os segmentos do RNA genômico do RV, que são previamente extraídos da amostra biológica, são separados em gel de poliacrilamida de acordo com as massas moleculares e a velocidade de migração (PEREIRA et al., 1983). O padrão genômico para os RV gp A em EGPA consiste de classes ou regiões de diferentes pesos moleculares contendo os segmentos de dsRNA 1 a 4 (Classe I); 5 e 6 (Classe II); 7, 8, e 9 (Classe III) e segmentos 10 e 11 (Classe IV). Esta disposição é frequentemente representada como 4-2-3-2, indicando o número de segmentos genômicos encontrados em cada classe do grupo A dos rotavírus. Uma importante característica dos RV pertencentes ao grupo A, é a comigração dos segmentos 7, 8, 9 em forma de *triplet* ou trinca, devido ao fato de seus respectivos pesos moleculares serem muito próximos. Por outro lado, rotavírus atípicos (grupos B-G) não apresentam este *triplet*. (SAIF e JIANG, 1994).

Entretanto, embora a EGPA possa determinar o eletroferogrupo de RV, não possibilita a definição do genotipo viral. Estirpes virais de um mesmo genotipo



podem apresentar perfis eletroforéticos diferentes, enquanto estirpes com perfis de migração eletroforética semelhantes podem pertencer a diferentes genótipos (BEARDS, 1982; MARKOWSKA-DANIEL et al., 1996).

Desta forma, a utilização de técnicas moleculares como a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) tem sido amplamente empregada tanto para o diagnóstico como para a caracterização dos genótipos G e P de RV. Para isso são utilizados pares de *primers* específicos que amplificam segmentos dos genes que codificam as proteínas VP7 (G tipo) e VP4 (P tipo) do RVA (GENTSCH et al., 1992). A identificação dos genótipos G e P de rotavírus em casos de diarreia neonatal é muito referenciada em estudos epidemiológicos de distribuição geográfica e sazonal (DESSELBERGER et al., 2001). Além disso, a genotipagem de RV tem permitido a descoberta de novos genótipos ou genótipos incomuns à espécie estudada, infecções mistas e rearranjos genômicos sugestivos de transmissões interespecies (HEIDE et al., 2005; GARAI COECHEA et al., 2006).

Os dados de frequência e a distribuição dos genótipos P e G em populações alvo são igualmente importantes para o desenvolvimento como para a monitoração de uma vacina eficaz para os RV, uma vez que genótipos distintos podem não induzir proteção heterotípica, principalmente nas primo-infecções (THEIL e SAIF, 1990; KAPIKIAN, 1994; GENTSCH et al., 1996).

## 2.7 Prevenção e Controle

A prevenção das diarreias neonatais, embora preferível, não é sempre possível em sistemas de criação intensivo de bezerros. O manejo apropriado do bezerro clinicamente afetado e do ambiente é crucial para minimizar as perdas econômicas e garantir a diminuição do impacto ao bem-estar animal e ambiental (LORENZ et al., 2011).

Entretanto, diferentemente de infecções entéricas bacterianas e parasitárias, a adoção de medidas higiênico-sanitárias isoladamente não é capaz de reduzir o número de casos clínicos de rotavirose, até mesmo em rebanhos de propriedades altamente tecnificadas. Entre as razões para o perfil diferenciado das rotavirose incluem: a) alta concentração de partículas virais excretadas no período agudo da doença ( $10^{11}$  partículas virais por grama de fezes); b) resistência dos virions às

condições ambientais e aos produtos químicos utilizados em desinfecção; c) presença de infecções subclínicas e de adultos portadores assintomáticos; d) possibilidade de transmissão interespecie (infecções heterólogas); e f) caráter endêmico da infecção. Os anticorpos rotavírus específicos presentes no colostro são particularmente importantes na proteção dos animais neonatos. Embora grande parte do anticorpo colostrado esteja na circulação, altos níveis de anticorpos séricos parecem não ser eficazes na proteção. Do contrário, imunoglobulinas presentes na luz intestinal participam efetivamente na proteção contra o rotavírus (ALFIERI et al., 2007). Recomenda-se que animais sadios ingiram três litros de colostro de boa qualidade das mães, dentro de quatro horas de nascimento, alcançando um total de quatro litros nas 12 primeiras horas de vida (CHIGERWE et al., 2009). Desta forma, a ingestão de colostro de boa qualidade pode prevenir a incidência da doença nos neonatos ou reduzir a severidade da diarreia. Com o propósito de fornecer colostro imune aos neonatos, preconiza-se a vacinação das fêmeas gestantes com antígenos de RV final da gestação (SAIF e FERNANDEZ, 1996; ALFIERI et al., 2007). As vacinas licenciadas para uso no Brasil e disponíveis comercialmente são a Bovilis®Triguard (MSD), a ScourGuard®4KC (Zoetis Inc) e a ROTATEC®J5 (Biogenesis). Estes imunógenos comerciais comumente incluem outros antígenos relacionados às diarreias neonatais tais como *Escherichia coli* F5, *Clostridium perfringens* tipo C, e coronavírus bovino. Os relatos de eficácia da prática da vacinação são bastante variáveis e os dados de benefício econômico são ainda escassos (LORENZ et al., 2011).

Silva et al. (2008) verificaram em pesquisa que o menor número de amostras positivas para rotavírus detectado na propriedade rural onde não foi realizada a vacinação sugere que a circulação do agente viral entre os animais pode ser suficiente para estabelecer um estado de imunização natural, sendo até mais eficiente quando comparado com o uso de vacina contra rotavírus.

Métodos de eletroferotipagem, como os realizados pelo EGPA, embora permita uma diferenciação entre as cepas de rotavírus por meio do perfil do genoma, não fornece dados sobre a antigenicidade das amostras. Nesse sentido são necessários outros estudos comparativos por meio de outra técnica para determinar a especificidade dos genótipos (G e P) de rotavírus detectados na população bovina, caso uma estratégia de vacinação seja implementada (BUZINARO et al., 2003).

A variação no sucesso da vacinação contra o rotavírus é influenciada pela dose de vacina, estirpe, inativação usada, adjuvante usado, pela via de administração, e por fim os níveis de exposição ambientais ao rotavírus. Em um modelo ideal de prevenção, o animal se infectaria com rotavírus subclínicamente sob a influência de uma adequada proteção passiva e posteriormente desenvolve a imunidade ativa, prevenindo-se assim contra a enfermidade (SAIF e FERNANDEZ, 1996).

## 2.8 Falhas vacinais

Entre os gastos extras relacionados a ocorrência das diarreias e seu controle está a imunoprofilaxia (PAUL e LYOO, 1993). Caruzo et al. (2010) pontua que é fundamental o bom manejo dos animais aliado à vacinação para o combate efetivo ao RV e redução nos prejuízos gerados. As vacinas foram desenvolvidas para uso em estágios finais da gravidez, objetivando a produção de altas concentrações de anticorpos RV específicos e transferência passiva aos neonatos via colostro. O principal efeito dos anticorpos RV específicos é apresentado no lúmen do intestino delgado, enquanto anticorpos séricos demonstraram pouco efeito para a prevenção da doença (DHAMA et al., 2009). Entretanto a diversidade genotípica dos RVs apresentada pelos genótipos P e G, torna-se um mecanismo de evasão ao sistema imune, comprometendo a eficácia da vacinação (PISANELLI et al., 2005).

No Brasil, em uma avaliação de rebanhos vacinados e sua eficácia frente a genótipos diferentes circulantes nos animais, constatou-se que a vacina não resulta em boa imunidade heteróloga, ou seja, não ocorre imunidade cruzada entre sorotipos diferentes, e ainda não é eficiente para proteger contra as diferentes combinações entre os genótipos P e G, não garantindo a prevenção da doença em rebanhos imunizados (BARREIROS et al., 2004). Falhas vacinais semelhantes contra o rotavírus, acarretadas por imunidade heteróloga insuficiente no combate a infecção, também foram identificadas em bezerras no México (RODRÍGUES-LIMA et al., 2009).

Ainda não é claro como as divergências antigênicas que ocorrem entre os antígenos vacinais e de campo afetam a eficácia da imunização (ALKAN et al., 2010). Assim, o desenvolvimento de novas vacinas, para combater eficazmente a

diarreia bovina por RV, sempre exigirá incorporação dos novos tipos de genótipos encontrados (MALIK et al., 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Realizar o diagnóstico e avaliação epidemiológica da rotavirose bovina, antes e após a introdução da vacinação materna, em uma propriedade leiteira de base familiar localizada no município de Mariluz, Paraná, com históricos recorrentes de diarreias em bezerros neonatos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar a ocorrência de rotavírus a partir de amostras fecais diarreicas de bezerros neonatos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida:
- Avaliar a morbidade, mortalidade e letalidade associada ao rotavírus bovino antes e após a introdução da vacinação materna;
- Avaliar a frequência de detecção de rotavírus em fezes de bezerros nascidos após a introdução da vacina preventiva nas vacas no período gestacional;
- Correlacionar a frequência de detecção de rotavírus bovino com a idade dos animais e paridade das vacas;
- Avaliar possíveis correlações entre a morbidade por rotavírus bovino e alguns parâmetros meteorológicos;
- Realizar a caracterização molecular dos genótipos G e P de amostras positivas para o rotavírus bovino antes e após a vacinação;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Localização e descrição do local de estudo

O presente trabalho foi realizado em uma propriedade de aptidão leiteira de base familiar localizada na cidade de Mariluz, Noroeste do Paraná, pertencente a microrregião de Umuarama. A propriedade possui uma extensão de 48,4 hectares e situa-se nas coordenadas 24° 00' 07" S e 53° 08' 45" W. O plantel com aproximadamente 70 vacas, é predominantemente formado por animais da raça Girolando e mestiços Holandês x Jersey. No aspecto sanitário, são efetuadas apenas as vacinações compulsórias contra a febre aftosa e a brucelose bovina.

Com instalações bastantes simples e pouco arejadas, o local não dispõe de piquete maternidade e os bezerros são mantidos em piquetes e baias coletivas (Figura 2), sem qualquer segregação por faixa etária (Figura 3). O fornecimento de colostro para os bezerros é realizado de forma natural (ao pé da vaca) até 12 horas após o nascimento. A propriedade utiliza o sistema de ordenha mecânica com a presença do bezerro ao pé da vaca, na frequência de duas vezes ao dia. A limpeza é ineficiente e pouco frequente, havendo acúmulo de dejetos nas áreas de permanência dos animais.

Figura 2 - Criação de bezerros em piquetes e baias coletivas



Fonte: Produção do próprio autor (2012).

Figura 3. Animais de diferentes faixas etárias mantidos em piquete coletivo.



Fonte: Produção do próprio autor (2012).

#### 4.2 Caracterização preliminar do problema e indicadores epidemiológicos

A propriedade selecionada já possuía histórico recorrente de surtos de diarreia neonatal, sendo frequente a apresentação de animais letárgicos excretando fezes profusas e líquidas (Figura 4) com evolução para a morte (Figura 5). Baseado neste histórico clínico a propriedade foi acompanhada durante oito meses (maio de 2012 a janeiro de 2013) para determinação de alguns indicadores epidemiológicos na população de risco (bezerros com até 30 dias de idade).

Durante o período estudado nasceram 31 bezerros, 23 apresentaram diarreia e destes, seis foram a óbito por consequências da desidratação e/ou infecções respiratórias secundárias. Assim, no período avaliado, as taxas de morbidade e mortalidade por diarreia foram de 74% e 19%, respectivamente. Foram coletadas amostras fecais de todos os bezerros sintomáticos para pesquisa de rotavírus pela técnica EGPA. A Tabela 1 apresenta os indicadores epidemiológicos da população de bezerros com até 30 dias de idade observada durante os oito meses de investigação preliminar. Uma vez que a EGPA só consegue detectar altas concentrações de vírus eliminados pelas fezes, ficou evidente a participação efetiva do rotavírus nos casos de diarreia neonatal nesta propriedade. Esta constatação

constituiu critério na decisão da introdução e avaliação do impacto da vacinação contra a rotavirose bovina na referida propriedade.

Tabela 1. Indicadores epidemiológicos da população de bezerros com até 30 dias de idade na propriedade de Mariluz, Paraná (maio de 2012 a janeiro de 2013).  
Fonte: Produção do próprio autor (2012).

<b>Indicadores epidemiológicos</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Morbidade (diarreia)	74%
Mortalidade (diarreia)	19%
Morbidade específica (rotavírus)	39%
Mortalidade específica (rotavírus)	13%
Letalidade (rotavírus)	33%



Figura 4. Bezerros letárgicos acometidos pela diarreia.



Fonte: Produção do próprio autor (2012).

Figura 5. Bezerro morto após apresentar diarreia.



Fonte: Produção do próprio autor (2012).

### 4.3 Vacina e vacinação

Foi utilizada uma vacina comercial inativada multivalente contendo os genótipos G6 e G10 do rotavírus bovino, coronavírus bovino, cepas enterotoxigênicas de *Escherichia coli* com fator de aderência pili K99 e *Clostridium perfringens* tipo C.

No período compreendido entre março de 2013 e fevereiro de 2014 foi instituída a vacinação das vacas e novilhas prenhes, conforme as instruções do fabricante. Por se tratar de uma primovacinação, foram administradas duas doses da vacina por via intramuscular na região do pescoço (Figura 6), com intervalo de três semanas entre as doses, sendo a segunda dose efetuada entre a terceira e sexta semana que antecedeu o parto. No instante da vacinação também foram registradas informações relacionadas à paridade da fêmea (novilha de 1ª cria, vaca de 2ª cria ou vaca de 3ª cria ou superior) conforme a Tabela 2.

Figura 6. Aplicação da vacina ScourGuard 4KC em uma vaca gestante, por via intramuscular na região do pescoço.



Fonte: Produção do próprio autor (2013)

Tabela 2. Distribuição das fêmeas avaliadas de acordo com a categoria (paridade) na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná.

<b>Categorias das fêmeas (paridade)</b>	<b>Quantidade</b>
Novilha de 1ª cria	10
Vaca 2ª cria	16
Vaca 3ª cria ou superior	37
TOTAL	63

Entretanto, nesta etapa do estudo, em decorrência de informações imprecisas do diagnóstico de prenhez no caderno de registro reprodutivo, não foi possível determinar a data aproximada do parto de alguns animais, prejudicando o manejo de intervenção profilática. Desta forma, das 63 fêmeas gestantes no período, o protocolo recomendado na primovacinação (2 doses) foi efetuado em 40 delas. Em 12 fêmeas foi realizado o protocolo vacinal incompleto (aplicação de uma única dose) e nas 11 restantes não foi realizada vacinação (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das fêmeas gestantes e o protocolo de primovacinação empregado na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná

<b>Primovacinação</b>	<b>Quantidade de vacas</b>
Completa	40
Incompleta	12
Sem vacinação	11
Total	63

#### 4.4 Amostras fecais

Para avaliar o impacto da vacinação contra a rotavirose na população de risco, foram coletadas amostras fecais de todos os bezerros nascidos (n=63) durante os 12 meses (março/2013 a janeiro/2014) de aplicação da vacina nas fêmeas gestantes.

Foram coletadas, diretamente da ampola retal, amostras de fezes representativas de cada animal aos 7, 14 e 21 dias de vida, independente da condição clínica (Figura 7). A amostra foi mantida sob refrigeração do momento da coleta até o processamento inicial no laboratório. Para a classificação das amostras, foram consideradas diarreicas as fezes de consistência líquida e não diarreicas

aquelas de consistência pastosa a sólida. A Tabela 4 apresenta a distribuição das amostras coletadas mensalmente.

Figura 7. Coleta de fezes diretamente da ampola retal.



Fonte: Produção do próprio autor (2013)

Tabela 4. Distribuição do número de amostras de fezes coletadas de acordo com a idade do animal em dias.

Data da coleta	Número de amostras por idade dos animais (dias)				Total
	7	14	21	> 30	
Mês/Ano					
Mar/13	1	1	0	0	2
Abr/13	4	3	3	0	10
Mai/13	9	5	6	0	20
Jun/13	2	6	6	0	14
Jul/13	4	1	1	0	6
Ago/13	9	11	5	0	25
Set/13	10	8	11	0	29
Out/13	5	6	8	5	24
Nov/13	2	3	4	0	9
Dez/13	5	4	4	0	13
Jan/14	8	7	4	0	19
Fev/14	4	5	7	0	16
Mar/14	0	1	2	0	3
<b>TOTAL</b>	<b>63</b>	<b>61</b>	<b>61</b>	<b>5</b>	<b>190</b>

#### 4.5 Extração bruta das fezes

As amostras foram diluídas em solução tampão de estabilização de rotavírus (TERV), pH 7,4 (Tris-HCl 50 mM; NaCl 10 mM; 2-mercaptoetanol 1,5 mM; CaCl<sub>2</sub> 3 mM) com concentração final de 10 a 20% (p/v), homogeneizadas por agitação mecânica vigorosa, centrifugadas a 2.000 rpm por 10 minutos, tendo o sobrenadante recolhido e estocado a 4°C para posterior análise.

#### 4.6 Extração do ácido nucleico viral

Para a extração do ácido nucleico viral foi utilizada a associação das técnicas fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/tiocianato de guanidina, conforme descrita por Alfieri et al. (2004). Alíquotas de 500 µL das suspensões fecais diluídas em TERV foram tratadas com sódio dodecil sulfato (SDS) 1% e mantidas em banho-maria a 56°C por minutos. Após, a cada amostra foi adicionado igual volume da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, homogeneizada por agitação mecânica, incubada em banho-maria a 56°C por 15 minutos e centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos (SAMBROOK; FRITSCH e MANIATIS, 1989). A fração aquosa obtida foi submetida ao tratamento com sílica e tiocianato de guanidina, conforme descrito por Boom et al. (1990). Os ácidos nucleicos extraídos foram eluídos da matriz de sílica em 50 µL de água ultrapura (MilliQ, Bedford, MA, USA) autoclavada e mantidos a -20°C para posterior uso. Para a certificação e validação dos procedimentos de extração realizados, foram incluídas amostras de água ultrapura autoclavada como controle negativo e amostras de fezes rotavírus positivas como controle positivo.

#### 4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida para detecção do rotavírus bovino (EGPA)

Após o procedimento de extração do ácido nucleico, as amostras foram submetidas à EGPA a 7,5% seguida de coloração por nitrato de prata para a

detecção e avaliação do perfil de migração dos 11 segmentos de RNA de fita dupla do rotavírus, de acordo com metodologia descrita Herring et al. (1982) e Pereira et al. (1983).

#### 4.8 Análise estatística

Para verificar a associação entre as variáveis estudadas foi utilizado o teste do qui-quadrado considerando como nível de significância valor de  $p < 0,05$ . Quando necessário, os dados foram corrigidos utilizando a correção de Yates (ZAR, 1996). Para algumas variáveis foram calculados os intervalos com confiança de 95% e a razão de probabilidades (*Odds ratio*) e o risco relativo. A análise estatística foi efetuada pelo programa Epi Info<sup>®</sup> versão 7.0 (Centers for Diseases Control and Prevention, Atlanta, EUA).

#### 4.9 Rotavírus e fatores climáticos

A associação da frequência de diagnóstico do RV com variáveis climáticas foi avaliada por estação climática e por distribuição mensal no período compreendido entre março de 2013 e fevereiro de 2014.

Os dados meteorológicos utilizados neste estudo foram obtidos junto ao Sistema Meteorológico do Paraná, Simepar. Foram utilizados os valores médios mensais e diários de precipitação pluviométrica ( $\text{mm}^3$ ), temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) e umidade relativa do ar (%) do ponto de referência mais próximo da propriedade estudada, a estação meteorológica da cidade de Umuarama.

#### 4.10 Genotipagem de RV

As amostras cujo genoma do rotavírus foi identificado pela EGPA foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina para amplificação e sequenciamento genômico. A RT-PCR foi realizada

utilizando os *primers* consensuais Beg9 e End9 (GOUVEA et al., 1990) que amplificam um fragmento de 1062 pb do gene que codifica a proteína VP7 (G tipo) e os pares con2 e con3 que amplificam um fragmento de 876 pb do gene que codifica a proteína VP4 (P tipo) conforme descrito por Gentsch et al. (1992).

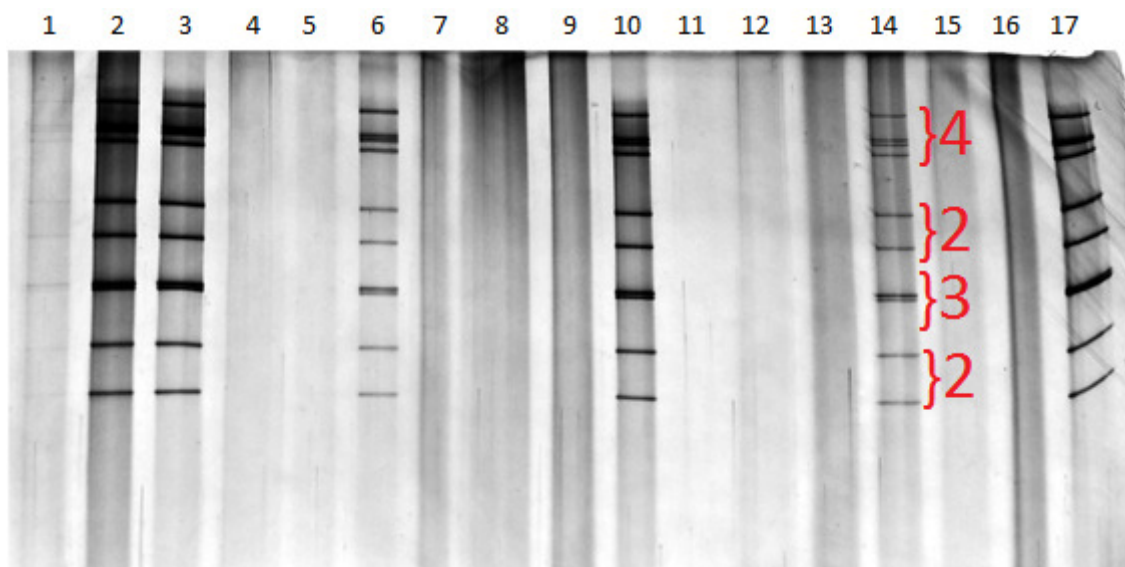
Os produtos amplificados foram purificados utilizando o kit PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, 17 Carlsbad, CA, USA), e a quantificação do DNA foi feita com fluorômetro Qubit™ (Invitrogen Life Technologies). A reação de sequenciamento de DNA foi realizada com BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®), em ambas as direções, no analisador genético automático modelo ABI 3500 (Applied Biosystems®).

A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelo programa Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). A determinação do genotipo das amostras baseou-se na análise de homologia das sequências nucleotídicas com outras sequências disponíveis depositadas em bases públicas de dados (GenBank) utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

## 5 RESULTADOS

Entre março de 2013 e fevereiro de 2014, período que foi instituída a vacinação das vacas e novilhas prenhes, a infecção de bezerros pelo RV foi comprovada pela EGPA com a detecção do dsRNA genômico viral nas amostras de fezes representativas de diversos animais. Todas as amostras RV positivas apresentaram perfil de migração compatível com o RVA (Figura 8).

Figura 8. Eletroforese em gel de poliacrilamida seguida pela coloração por nitrato de prata de ácidos nucleicos extraídos de amostras fecais de bezerros da propriedade de Mariluz, Paraná (maio de 2013 a janeiro de 2014). Canaletas 1, 2, 3, 6, 10, 14: amostras positivas com perfil de migração característico do RVA (perfil 4-2-3-2); 4, 5, 7-9, 11-13, 16: amostras negativas; 17: controle positivo de RVA.



A quantidade de animais nascidos, de positivos para RV, óbitos gerais e óbitos de animais RV positivos nos dois períodos de avaliação (antes e após a introdução da vacinação contra o RV) na propriedade está expressa em números absolutos na Tabela 5.



Tabela 5. Números absolutos de animais nascidos, positivos para RV, óbitos (diarreia) e óbitos (RV positivos) nos períodos de estudo antes e após a introdução da vacina na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná.

Variáveis (em números absolutos)	Período de estudo			
	Antes Vacinação (mai/12 a jan/13)	Após introdução da vacina (mar/13 a fev/14)		
		Sem vacinação	Incompleto	Completo
Nº de nascidos	31	11	12	40
Nº de animais RV positivos	12	6	8	19
Nº óbitos (por diarreia)	6	2	1	4
Nº óbitos (RV positivos)	4	2	1	2

A partir dos números indicados na tabela 5, foram calculados e obtidos os indicadores epidemiológicos na população de bezerros nascidos antes e após a vacinação. No período que compreendeu a introdução da vacinação no rebanho (março 2013 a fevereiro de 2014), os indicadores foram calculados tanto sobre a população total de bezerros, independente do protocolo de vacinação (Tabela 6) como também sobre o grupo de bezerros de acordo com o esquema de imunização materna (Tabela 7).

Tabela 6. Taxas epidemiológicas de morbidade de RV, mortalidade geral, mortalidade e letalidade específica por RV na população de bezerros com até 30 dias de idade, nos períodos de estudo antes e após a introdução vacinação materna contra rotavirose na propriedade de Mariluz, Paraná.

Indicadores epidemiológicos	Período de estudo	
	Antes Vacinação (mai/12 a jan/13)	Após a introdução da vacina (mar/13 a fev/14)
	n=31	n=63
Morbidade por RV	39%	52%
Mortalidade por diarreia	19%	11%
Mortalidade específica RV	13%	8%
Letalidade RV	33%	15%

Exceto para a taxa de morbidade por RV, que sofreu um aumento de 13% os demais indicadores epidemiológicos apresentaram reduções que variaram entre 5 e 18% após a introdução da vacinação na propriedade (Tabela 6). Até mesmo na comparação com o grupo de animais nascidos de vacas que sofreram o protocolo

ideal (completo com duas doses) na primovacinação, a taxa de morbidade aumentou em 9% (Tabela 7).

Tabela 7. Taxas epidemiológicas de morbidade de RV, mortalidade geral, mortalidade específica e letalidade na população de bezerros com até 30 dias de idade, nos períodos de estudo antes e após a introdução da vacinação materna sob diferentes protocolos de imunização na propriedade de Mariluz, Paraná.

Indicadores epidemiológicos	Período de estudo			
	Antes Vacinação (mai/12 a jan/13)	Após a introdução da vacina (mar/13 a fev/14)		
		Sem vacinação	Incompleto	Completo
Morbidade de RV	39%	55%	67%	48%
Mortalidade por diarreia	19%	18%	8%	10%
Mortalidade específica RV	13%	18%	8%	5%
Letalidade	33%	33%	13%	11%

Nas demais comparações por grupos de animais conforme o protocolo de imunização materna, nota-se que os coeficientes de letalidade e de mortalidade por diarreia foram iguais ou muito próximos na população de bezerros no período antes da vacinação e após a introdução da vacinação no grupo de animais nascidos de vacas não vacinadas (Tabela 7). No entanto, houve reduções de 9, 8 e 22% nos coeficientes de mortalidade por diarreia, mortalidade específica por RV e letalidade, respectivamente, quando comparado com o grupo de animais antes da vacinação. Embora a redução percentual destes últimos indicadores sugeriu ser expressiva, não houve diferença significativa entre as populações avaliadas nos respectivos períodos e condições especificadas (dados não apresentados).

Num segundo momento as análises foram direcionadas ao período que compreendeu a vacinação do rebanho (março de 2013 a fevereiro de 2014). Assim, ao compararmos a distribuição dos resultados positivos para RV nos bezerros nascidos conforme o protocolo da primovacinação materna (Tabela 8), verifica-se um menor percentual no grupo que sofreu o protocolo completo de vacinação (duas doses). Entretanto, a análise estatística utilizando o teste do qui-quadrado não demonstrou diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

Tabela 8. Distribuição de resultados positivos e negativos para RV por EGPA nas amostras de fezes de animais nascidos conforme o protocolo da primovacinação nas fêmeas gestantes da propriedade de Mariluz, Paraná (março de 2013 a fevereiro de 2014).

Protocolo primovacinação	Diagnóstico de RV por EGPA				Total
	Positivo	(%)	Negativo	(%)	
Completa	19	47,50	21	52,50	40
Incompleta	8	66,67	4	33,33	12
Sem vacinação	6	54,55	5	45,45	11
Total	33	52,38	30	47,62	63

$$\chi^2 = 1,3791 \quad p = 0,501576$$

A Tabela 9 correlaciona as variáveis entre si por meio de tabelas de contingência 2x2. Os indicadores epidemiológicos *Odds Ratio* (OR) e Risco Relativo (RR) foram calculados para medir a força da associação entre o manejo da primovacinação nas fêmeas gestantes e a frequência detecção de RV nos bezerros nascidos. Mesmo com a ausência de significância estatística ( $P > 0,05$ ), notou-se que em animais nascidos de vacas não vacinadas e vacinadas com apenas uma dose aumentou o risco de infecção pelo RV em 1,15 e 1,40 vezes, respectivamente.

Tabela 9. Distribuição da frequência de diagnóstico positivo para RV pela EGPA e indicadores epidemiológicos em relação aos protocolos de primovacinação realizados nas fêmeas gestantes da propriedade de Mariluz, Paraná (maio de 2013 a fevereiro de 2014).

Protocolo de primovacinação	Diagnóstico de RV		Indicadores epidemiológicos			
	Pos. (%)	Neg. (%)	$\chi^2$	p<0,05	OR (IC)	RR (IC)
Sem vacinação	6 (54,55)	5 (45,45)	0,171	0,6789	1,3263 (0,35-5,06)	1,1483 (0,61-2,16)
Completo (2 doses)	19 (47,50)	21 (52,50)				
Incompleto (1 dose)	8 (66,67)	4 (33,33)	1,358	0,2438	2,2105 (0,57-8,54)	1,4035 (0,84-2,35)
Completo (2 doses)	19 (47,50)	21 (52,50)				
Sem vacinação	6 (54,55)	5 (45,45)	0,354	0,5518	0,6000 (0,11-3,25)	0,8182 (0,42-1,60)
Incompleto (1 dose)	8 (66,67)	4 (33,33)				

Pos=positivos; Neg=negativos;  $\chi^2$ = qui-quadrado; OR=*Odds Ratio*;  
RR=Risco relativo; IC=Intervalo de confiança de 95%

A categoria das fêmeas gestantes de acordo com o número de partos não constituiu um fator determinante para a infecção pelo RV, visto a ausência de significância estatística ( $p > 0,05$ ) apresentada na Tabela 10.

Ao analisarmos a distribuição dos resultados positivos para RV de acordo com a idade dos animais infectados, a maior frequência (30,16%) de detecção ocorreu nas fezes coletadas de animais com sete dias de idade e foi estatisticamente significativa (Tabela 11).

Tabela 10. Frequência de diagnóstico de RV por EGPA de acordo com a paridade das fêmeas gestantes na propriedade de Mariluz, Paraná (março de 2013 a fevereiro de 2014).

Categoria das fêmeas (por paridade)	Diagnóstico de RV por EGPA				
	Positivo	(%)	Negativo	(%)	TOTAL
Novilhas 1ª cria	7	70	3	30	10
Vacas 2ª cria	5	31,25	11	68,75	16
Vacas 3ª cria ou superior	21	56,75	16	43,25	37
<b>TOTAL</b>	<b>33</b>	<b>52,38</b>	<b>30</b>	<b>47,62</b>	<b>63</b>

$\chi^2=4,39$   $p=0,111$

Tabela 11. Distribuição da frequência de diagnóstico de RV por EGPA, de acordo com a idade dos animais da propriedade de Mariluz, Paraná (março de 2013 a fevereiro de 2014).

Idade (dias)	Diagnóstico de RV por EGPA		
	Positivos (%)	Negativos (%)	Total
Sete	19 <sup>a</sup> (30,16)	44 (69,84)	63
Catorze	7 <sup>b</sup> (11,48)	54 (88,52)	61
Vinte e um	2 <sup>b</sup> (3,28)	59 (96,72)	61
Total	28 (15,14)	157 (84,86)	185

$\chi^2=18,38$   $p=0,000102$

O teste comparativo das idades com os indicadores epidemiológicos calculados – qui-quadrado, valor de p, OR e RR – são apresentados na Tabela 12. O risco de infecção aos sete dias foi 2,63 e 9,20 vezes maior quando comparado aos 14 e 21 dias, respectivamente. Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre os 14 dias e 21 dias. Portanto há uma relação inversa entre a idade e o risco de infecção pelo RV.

Outro fator avaliado foi a possibilidade de interferência da temperatura, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar na frequência de diagnóstico de RV. Na Figura 9 são representadas as distribuições das frequências de casos positivos para RV e os indicadores climáticos nas quatro estações do ano. As frequências detectadas de RV foram diretamente proporcionais à temperatura

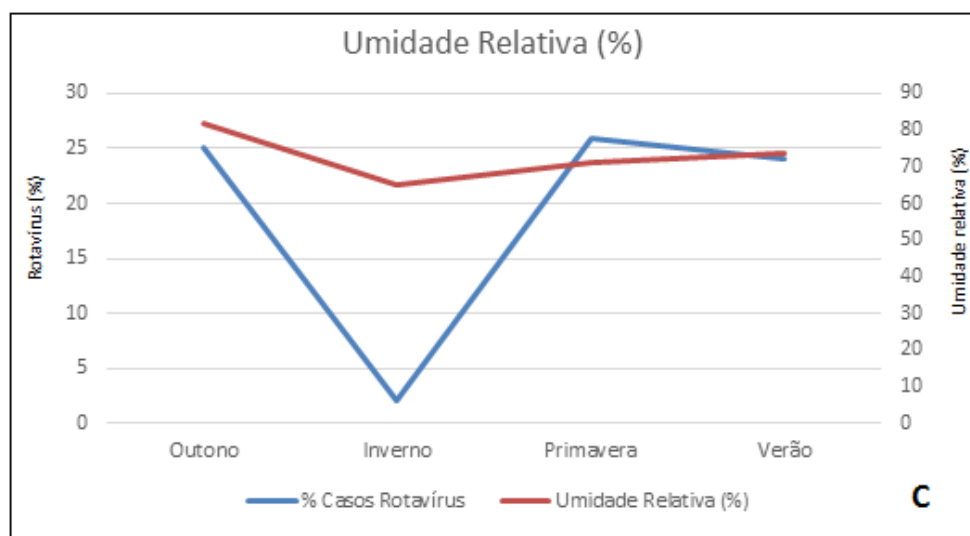
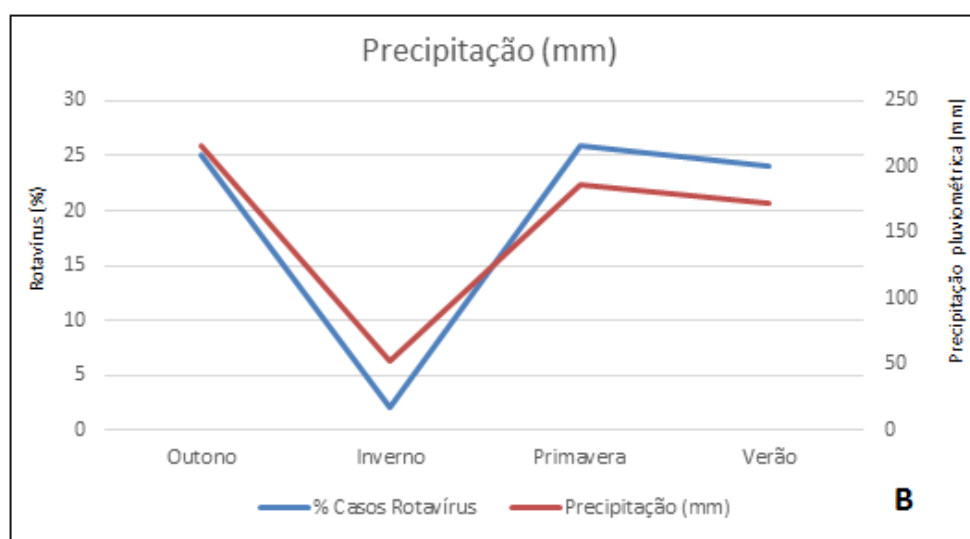
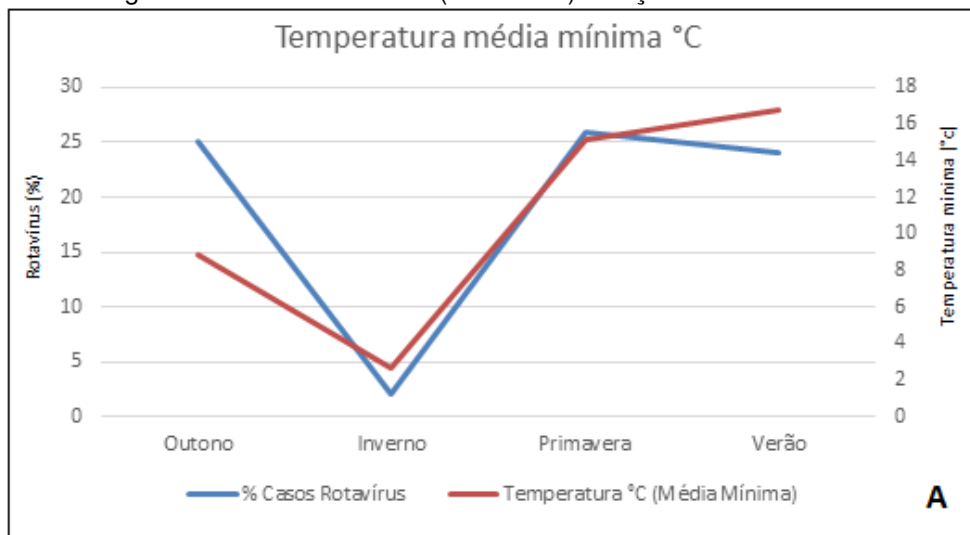
mínima e precipitação pluviométrica na distribuição sazonal por estações do ano. Não foi possível estabelecer uma associação entre os casos de RV e a umidade relativa do ar. Ao longo do período avaliado os índices médios de umidade relativa se mantiveram dentro da normalidade (Apêndice) e a máxima variação registrada foi de aproximadamente 20%. As maiores frequências foram encontradas durante o outono e a primavera. O inverno foi a estação climática com o menor número de casos positivos, coincidindo com os menores índices de temperatura mínima e precipitação pluviométrica.

Tabela 12. Distribuição da frequência de diagnóstico para RV pela EGPA e indicadores epidemiológicos em relação à idade dos animais na propriedade de Mariluz, Paraná (maio de 2013 a fevereiro de 2014).

Idade	Diagnóstico de RV por EGPA				Indicadores epidemiológicos			
	Pos.	(%)	Neg.	(%)	$\chi^2$	p<0,05	OR (IC)	RR (IC)
7 dias	19	30,16	44	69,84	6,528	0,0106	3,33 (1,28-8,64)	2,63 (1,19-5,80)
14 dias	7	11,48	54	88,52				
7 dias	19	30,16	44	69,84	15,918	0,0001	12,74 (2,82-57,57)	9,20 (2,24-37,82)
21 dias	2	3,28	59	96,72				
14 dias	7	11,48	54	88,52	2,999	0,0833	3,82 (0,76-19,21)	3,50 (0,76-16,18)
21 dias	2	3,28	59	96,72				

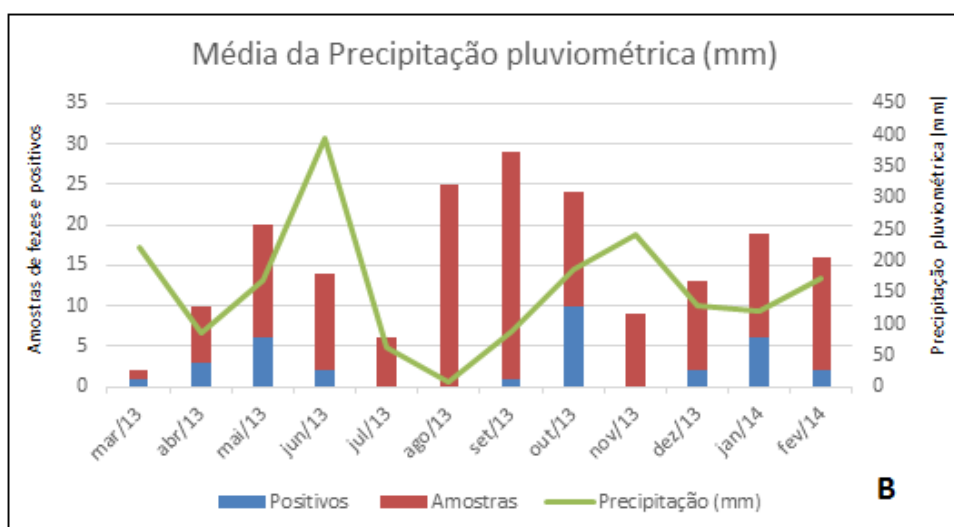
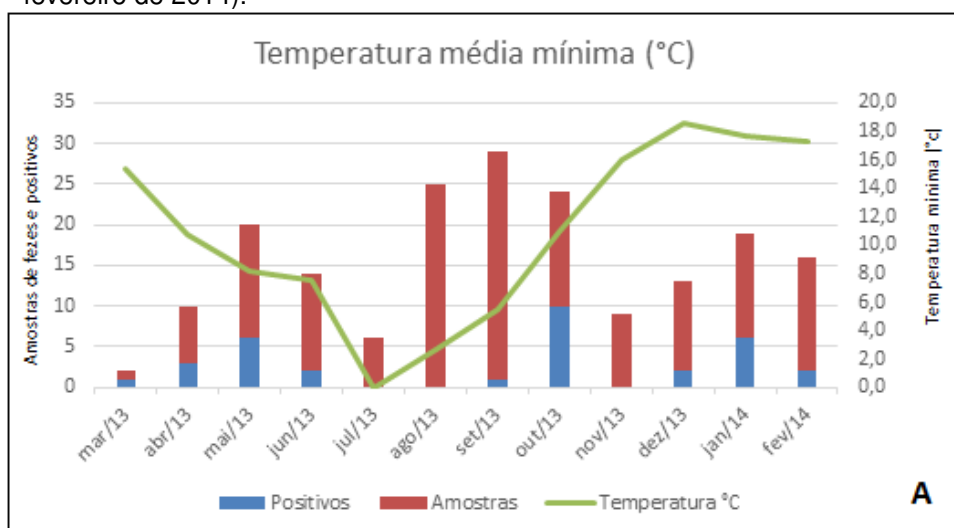
Pos=positivos; Neg=negativos;  $\chi^2$ = qui-quadrado; OR=*Odds Ratio*; RR=Risco relativo; IC=Intervalo de confiança de 95%

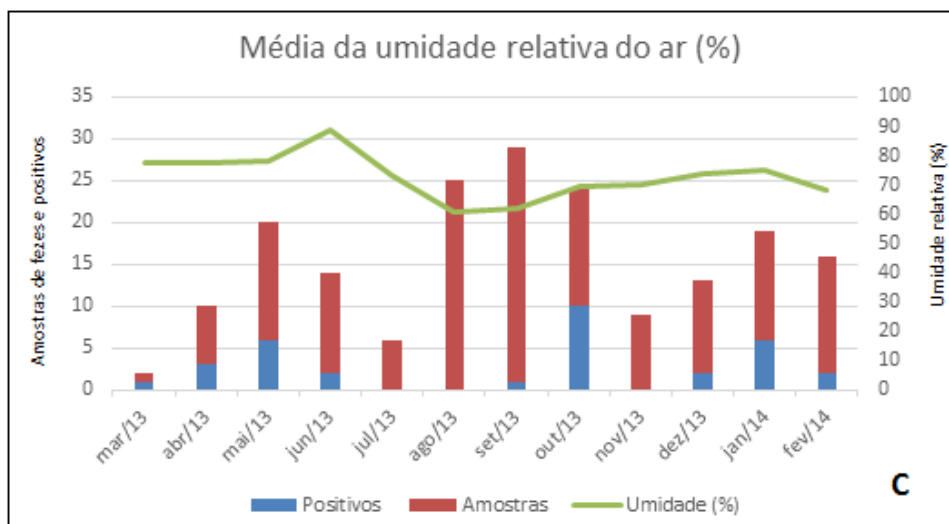
Figura 9 Distribuição da frequência de diagnóstico de rotavírus grupo A (n=33) por estações do ano, de acordo com as variáveis climáticas. (março de 2013 a fevereiro de 2014). Painei A: Média da temperatura mínima (°C); Painei B: Média da precipitação pluviométrica (mm). Painei C: Média da umidade relativa do ar (%). Dados do Serviço de Informação Meteorológica do Estado do Paraná (SIMEPAR) estação de Umuarama.



A distribuição mensal das amostras positivas de acordo com os indicadores climáticos está representada na Figura 10. Verifica-se que mesmo nos meses (agosto e setembro de 2013) que apresentaram um grande número de amostras coletadas, ou seja, indicando uma grande concentração de animais susceptíveis, foram registrados poucos ou nenhum resultado positivo entre as amostras. A distribuição dos resultados positivos permite sugerir que temperaturas mínimas e precipitações pluviométricas baixas não interferiram na epidemiologia da rotavirose bovina na propriedade avaliada.

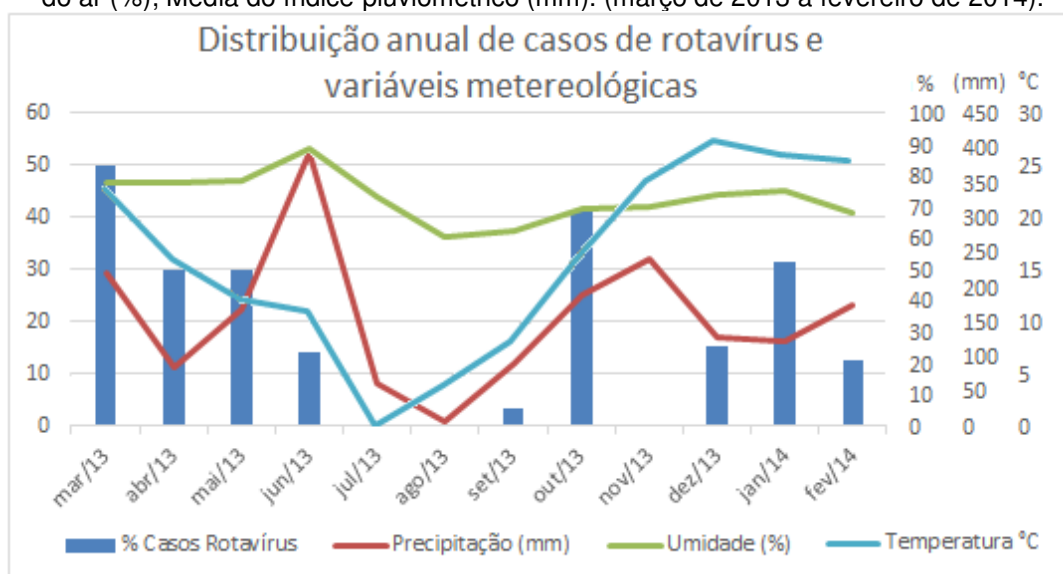
Figura 10. Distribuição mensal de amostras coletadas e resultados positivos para RV de acordo com as médias dos indicadores climáticos. Painel A: temperatura mínima (°C); Painel B: precipitação pluviométrica (mm); Painel C: umidade relativa do ar (%) (março de 2013 a fevereiro de 2014).





A Figura 11 demonstra a distribuição mensal da frequência de resultados positivos com a sobreposição dos indicadores climáticos. Novamente observa-se que o RV esteve ausente nos meses mais frios e com pouca precipitação pluviométrica (julho e agosto de 2013) e no início da primavera onde há o aumento e intensidade das chuvas, há uma tendência para o aumento de número de casos. O mês de março de 2013 apresentou 50% de casos positivos, entretanto a elevada frequência se deve ao número reduzido de amostras (duas amostras), das quais uma resultou positiva.

Figura 11 Distribuição da frequência mensal de diagnóstico de rotavírus (%) de acordo com as variáveis meteorológicas: Média da temperatura mínima (°C); Média da umidade relativa do ar (%); Média do índice pluviométrico (mm). (março de 2013 a fevereiro de 2014).





Um fato relevante observado no período de estudo foi a ocorrência de um surto de RV que acometeu 41% (11/27) dos bezerros com até 120 dias de idade, entre 04 e 16 de outubro de 2013 (dados não apresentados). No surto animais de sete dias, 14 dias, 21 dias foram acometidos, porém animais mais velhos, com até 116 dias de idade também apresentaram diarreia e eliminaram o RVA nas fezes (Tabela 14). Neste período, por consequências da desidratação e infecções secundárias, foi registrada a morte de quatro animais, dos quais a presença do RV foi confirmada nas fezes de três deles.

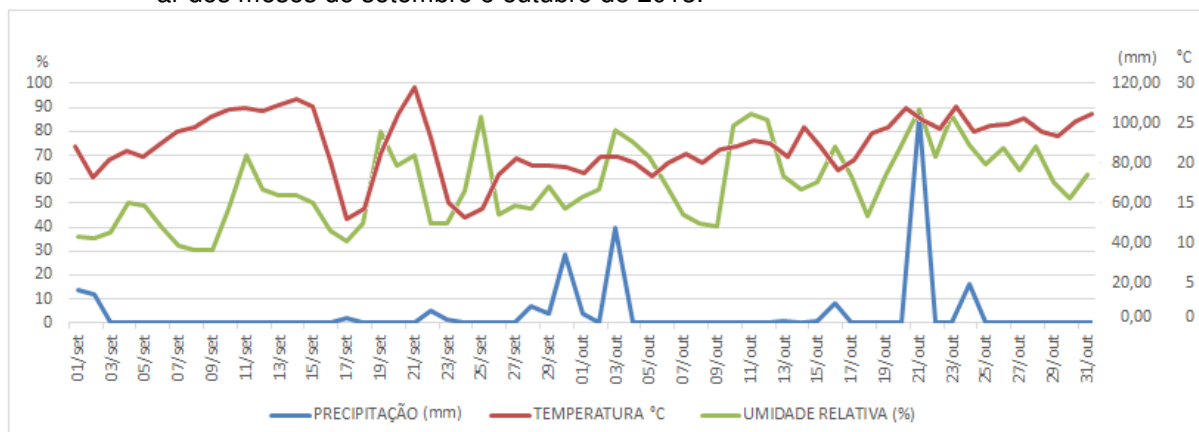
Ao analisarmos os valores diários dos indicadores que antecedeu o surto (seis dias antes do registro dos primeiros casos) verificou-se que a precipitação pluviométrica foi aproximadamente quatro vezes maior que a média obtida nos meses de setembro e outubro (Tabela 13). A umidade relativa e a temperatura não sofreram grandes alterações no período.

Tabela 13. Comparação entre as médias dos indicadores climáticos dos meses de Setembro e Outubro com as média dos seis dias que antecederam o início do surto.

Período	Precipitação	Temperatura	Umidade
	(mm)	Média (°C)	Relativa (%)
seis dias antes do surto (28/09/13 a 03/10/13)	16,533	19,859	56,922
setembro a outubro 2013	4,525	22,241	57,503

A Figura 12 apresenta as medições diárias das variáveis meteorológicas nos meses de setembro e outubro de 2013, destacando-se os seis dias que antecederam o início do surto (04/10/13). Pode-se notar que os seis dias que antecederam o surto correspondeu a um período chuvoso com umidade relativa oscilando próximo dos 50%.

Figura 12. Distribuição diária da precipitação pluviométrica, temperatura média e umidade relativa do ar dos meses de setembro e outubro de 2013.



A Tabela 14 apresenta as características dos animais envolvidos no surto incluindo dados relacionados à idade, sexo, raça, consistência das fezes, desfecho clínico (morte ou vida) e ordem de cria da fêmea. A idade dos animais que foram a óbito indicam uma maior gravidade nos animais com até 21 dias de idade, visto que os cinco animais mais velhos (47 a 116 dias) envolvidos no surto recuperaram-se sem graves complicações.

Tabela 14. Características dos animais envolvidos no surto de rotavirose bovina na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná (04 a 16 de outubro de 2013).

Bezerro (nome mãe)	Idade (dias)	Sexo	Primovacinação da mãe	Desfecho clínico	Características		
					Fezes	Raça	Cria
PIPOCA	7	M	Completa	Vida	Pastosa	Girolando	2ª
CORAÇÃO	7	F	Não vacinada	Morte	Líquidas	Girolando	1ª
PINTASILVA	7	M	Completa	Morte	Pastosa	Girolando	4ª
CABRITA	14	M	Não vacinada	Vida	Líquidas	Jersey holando	5ª
CHIFRINHA	14	M	Incompleta	Morte	Líquidas	Girolando	2ª
BORRACHA	21	M	Não vacinada	Vida	Líquidas	Holandês	1ª
BRASINHA	47	F	Completa	Vida	Líquidas	Girolando	6ª
MARELINHA JERSEY	49	M	Completa	Vida	Líquidas	Jersey holando	1ª
GAUCHINHA	56	F	Incompleta	Vida	Líquidas	Jersey holando	4ª
ASA BRANCA	88	F	Não vacinada	Vida	Líquidas	Girolando	2ª
ESTRELINHA	116	M	Incompleta	Vida	Líquidas	Jersey holando	2ª

M: macho; F: fêmea

Em relação à genotipagem dos RVA triados previamente pela EGPA, foi possível à amplificação e sequenciamento de fragmentos dos genes que codificam

as proteínas VP4 e/ou VP7 de apenas oito amostras. A Tabela 14 mostra relaciona os genótipos G[P] identificados e o número de amostras de acordo com o período de estudo. Entre os genótipos encontrados estão inclusos o G6, G10, P[5] e P[11]. Em algumas amostras não foi possível a caracterização do genótipo [P], sendo representado pela letra X.

Tabela 15. Genótipos G[P] de RVA detectados nas fezes de bezerros da propriedade de Mariluz, Paraná (2012-2013).

<b>Período de estudo</b>	<b>Genótipos de RVA G[P] (n)</b>
Antes da vacinação	G6P[X] (n=2)
Após vacinação	
Completa	G10P[11] (n=2); G10P[X] (n=1)
Incompleta	G6P[5] (n=1); G6P[X] (n=1)
Sem vacinação	G6P[5] (n=1)

## 6 DISCUSSÃO

O RVA é reconhecidamente o agente etiológico viral mais frequentemente associado às diarreias neonatais em bezerros no mundo (WOODE 1976; KHARALAMBIEV; GEORGIEV e MITOV, 1983; CASTRUCCI et al. 1988; CHAUHAN e SINGH 1996; VENDE et al. 1999; PISANELLI et al. 2005; ALFIERI et al. 2006; GHOSH et al. 2007). Estudos realizados sobre a ocorrência do RVA em bovinos em diversas regiões do Brasil, tantos na pecuária de corte como de leite, têm sido documentadas com taxas de morbidade variando de 3 a 30% (BARBOSA et al., 1988; BRITO et al., 1994; BUZINARO et al., 2000; JEREZ et al., 2002; ALFIERI et al., 2006). Na avaliação prévia (maio de 2012 a janeiro de 2013) da propriedade leiteira familiar descrita neste estudo, foram constatadas elevadas taxas de morbidade (39%) e mortalidade (13%) por RVA na população de bezerros neonatos com até 30 dias de idade.

Assim, após a confirmação do problema sanitário envolvendo o RVA, foram identificados alguns fatores ambientais e de manejo que poderiam estar associados à alta taxa de infecção entre os animais. Entre as falhas apontadas incluem o manejo higiênico deficiente das instalações, mistura e superlotação de animais de diferentes faixas etárias no mesmo piquete ou baia e o não isolamento de animais diarreicos, todas já claramente evidenciadas como fatores de risco da rotavirose por Bartels et al. (2010) e Freitas et al. (2011).

Boas práticas de higiene e manejo adequado dos animais associadas com a vacinação materna têm sido adotadas mundialmente no controle e profilaxia da rotavirose bovina (DHAMA et al., 2009). Uma vez que o proprietário não se mostrou disponível para adequar as instalações físicas para o manejo e abrigo dos animais, foi instituída a partir de março de 2013, apenas a vacinação das fêmeas gestantes com vistas à prevenção da enfermidade. Um dos objetivos do estudo foi avaliar a eficácia da vacina frente ao desafio natural dos animais expostos num ambiente altamente contaminado com o RVA, e sem qualquer interferência no manejo. Após a introdução da vacina na propriedade, procedeu a avaliação longitudinal prospectiva da incidência de RVA em todos os animais nascidos ao longo de doze meses de estudo (março de 2013 a fevereiro de 2014). Embora na comparação dos indicadores epidemiológicos nos dois períodos distintos de estudo (antes e após a

introdução da vacinação) foram observadas reduções chamativas nas taxas de mortalidade por diarreia, mortalidade específica por RV e letalidade por RV (Tabela 6), não houve significância estatística. O mesmo padrão foi apresentado na comparação com o grupo de animais nascidos de vacas com o protocolo completo na primovacinação (Tabela 7). Curiosamente, a taxa de morbidade por RV aumentou no período após introdução da vacinação, porém, também não foram significativas.

No segundo momento da pesquisa, direcionado apenas ao período pós vacinação, verificou-se que a primovacinação materna em condições ideais (completa com duas doses) não foi capaz de conferir proteção aos bezerros contra a infecção pelo RV quando comparados aos demais grupos (não vacinados e incompleto), conforme demonstrado nas Tabelas 7 e 8. Resultados semelhantes também já foi relatado por Kaplon et al. (2013), onde o RVA esteve presente nas fezes diarreicas de 55,3% (21/38) dos animais nascidos de vacas vacinadas e em 65,1% (28/43) de vacas não vacinadas, não apresentando diferença estatística ( $p = 0,495$ ). No Canadá, Waltner-Towes et al. (1982) relataram que a vacinação materna não foi efetiva para prevenir a diarreia em bezerros ou mortalidade sob condições a campo. Snodgrass et al. (1980) verificaram que a vacinação materna apenas retardou o início da diarreia nos bezerros submetidos à exposição viral, sem entretanto reduzir a gravidade. Kohara et al. (1997), além de não verificarem diferenças na proteção dos bezerros, constataram que a estirpe de rotavírus circulante era diferente da estirpe constituinte da vacina. No Brasil, Silva et al. (2008) relataram que a infecção pelo RV foi significativamente maior nos bezerros nascidos de vacas imunizadas contra rotavirose. No estudo realizado em dois rebanhos (68 vacas), sem infecções concomitantes, a prevalência da diarreia foi reduzida significativamente em bezerros nascidos de vacas vacinadas (SNODGRASS, 1986). Mc McNult e Logan (1987) observaram que a vacinação materna foi capaz de proteger os bezerros frente à infecção viral em condições naturais a campo. E um estudo subsequente, a vacinação sob condições naturais a campo resultou em reduzida eliminação de RV e diarreia em bezerros.

Devido aos resultados conflitantes descritos na literatura, a utilização da vacina como método profilático, ainda é muito controversa. Porém, a interpretação dos resultados pode ser complicada por inúmeros fatores, incluindo o delineamento a campo (comparação de dados históricos ou análise de vacas vacinadas e não

vacinadas no mesmo rebanho), ocorrência de co-infecções por outros enteropatógenos tais como *Escherichia coli*, *Cryptosporidium* e coronavírus bovino (SAIF e FERNANDEZ, 1986). O declínio nas taxas de imunoglobulinas transferidas passivamente pelo colostro e a baixa capacidade antigênica da vacina, também foram indicadas como possíveis causas para os índices insatisfatórios de prevenção (WALTNER-TOEWS et al., 1985). Na propriedade familiar de Mariluz o protozoário *Cryptosporidium* foi detectado nas fezes de alguns animais incluídos neste estudo, tanto em infecções singulares como em infecções mistas associadas ao RVA (dados não apresentados). Além disso, em decorrência de informações imprecisas do diagnóstico de prenhez para estimativa do parto, resultou em grupos heterogêneos de vacas quanto à primovacinação contra rotavirose. Das 63 fêmeas prenhes, 40 receberam as duas doses recomendadas da vacina inativada no período pré parto, atingindo uma cobertura vacinal de apenas 63%. Embora não seja a condição ideal, a falta de um efetivo controle reprodutivo constitui um problema de muitas propriedades leiteiras de base familiar de nossa região e, portanto, a eficácia da vacina frente a esta realidade também deve ser considerada.

Ainda, dada a continuidade da vacinação do rebanho nos meses subsequentes ao término da pesquisa até o presente momento, o produtor relatou que não houve qualquer óbito por diarreia e os eventuais casos ocorridos apresentaram-se com menor intensidade e rápida recuperação do animal. Em um rebanho experimental da Argentina, uma diminuição progressiva na taxa de mortalidade e morbidade prevalente devido à diarreia foi observada após três sucessivos anos de vacinação. Os autores descreveram que doses repetitivas da vacina inativada contendo o genotipo G6 do RV permitiram a redução da quantidade e a duração da eliminação viral por bezerros no campo, reduzindo efetivamente o nível de exposição de RV no rebanho (CORNAGLIA; FERNANDEZ; GOTTSCHALK, 1992). A redução das taxas de mortalidade por diarreia, mortalidade específica e letalidade não foram significativas em nosso estudo, mas apresentou uma tendência à diminuição (Apêndice A).

Considerando a informação de que novilhas e vacas de 2ª cria produzem colostro com níveis de IgG mais reduzidos do que vacas com mais de duas crias, distribuimos a frequência de resultados positivos para RV de acordo com a paridade das vacas). Relata-se que bezerros nascidos de novilhas primíparas vacinadas apresentaram maior morbidade devido à diarreia por RV do que bezerros nascidos

de vacas vacinadas múltiparas (SAIF e FERNANDEZ, 1986). Entretanto, em nosso estudo, não observamos qualquer associação significativa entre essas variáveis e a frequência de detecção de RVA (Tabela 10).

Feitosa, et al (2003) constataram que a partir de 24 horas, inicia-se uma progressiva diminuição nos valores séricos da IgM e IgG nos bezerros até os 30 dias de idade, seguida por discretos aumentos indicando o estabelecimento de uma imunidade ativa. No presente trabalho a idade de sete dias foi significativamente a mais relacionada aos casos positivos de RVA (Tabela 11). O risco de infecção nos animais com sete dias de idade foi 2,63 a 9,20 vezes maior do que nos animais com 14 e 21 dias respectivamente. Entretanto Buzinaro et al. (2009), encontrou diferença significativa em bezerros na faixa etária de 16 a 30 dias, que apresentaram maior frequência de infecção por rotavírus (10,5%), diferindo significativamente da faixa de 31 a 45 dias ( $\chi^2 = 7,09$ ;  $p < 0,01$ ). Freitas et al. (2011) também encontraram resultados que indicam uma maior frequência de infecção em neonatos com idade entre um e 15 dias, estabelecendo assim, uma relação inversa entre a frequência de positividade e a idade dos animais ( $P < 0,05$ ). Pode-se sugerir que o início do declínio da imunidade passiva associado a uma grande pressão de infecção possa ter contribuído com a infecção dos animais mais jovens.

Em relação à sazonalidade as maiores frequências de resultados positivos para RVA foram registradas no outono e na primavera de 2013. Nossos resultados concordam com o único relato que avalia a sazonalidade das infecções pelo RV bovino no Brasil. Neste trabalho a maior prevalência dos casos também ocorreu na primavera em bezerros provenientes de rebanhos leiteiros do estado de São Paulo (BUZINARO et al., 2000). O inverno foi a estação climática com a menor frequência de detecção do RV nas fezes, contrariando os resultados de um estudo epidemiológico em bezerros infectados pelo RVA na Índia (CHAUHAN e SINGH, 1996).

Considerando os indicadores climáticos, as variações na frequência de detecção do RVA foram diretamente proporcionais às variações da temperatura mínima e precipitação pluviométrica na distribuição por estação do ano (Figura 9). No entanto, a escassez de dados nacionais e internacionais dos efeitos climáticos sobre a prevalência de RV em sistemas de criação de bovinos nos impede de estabelecer comparações. Embora os efeitos dos fatores meteorológicos na epidemiologia da infecção sejam complexos, diversos estudos sugerem que

temperaturas baixas, baixa umidade relativa do ar e níveis baixos de precipitação aumentam o risco de transmissão da infecção pelo RVA em crianças (ATCHISON et al., 2010). Em suínos, alguns pesquisadores indicam uma correlação do aumento dos casos de RV principalmente com a diminuição da umidade relativa do ar, quando comparado a outros períodos com umidade maior (ALFIERI et al., 1999; CARDOSO et. al., 2003). Segundo Utrera et al. (1984), níveis baixos de umidade relativa influenciam a formação e o tamanho de aerossóis, indicando que em períodos secos o transporte de partículas virais presentes em poeiras oriundas de locais com fezes é mais facilitado. Em nosso estudo não conseguimos estabelecer qualquer tendência à infecção baseado na umidade relativa do ar. Ao analisarmos os painéis de gráficos por estação do ano, o inverno, que foi seco e com pouca chuva, apresentou um número muito baixo de casos, mesmo com a maior concentração de nascimentos registrados no período de estudo.

A ocorrência de um surto de rotavirose durante a primavera (04 e 16 de outubro de 2013) acometeu animais de diferentes idades. Na análise das amostras coletadas durante este surto, 11 animais estavam infectados com o RVA e resultou na morte de três deles. Oportuno ressaltar que, embora a infecção pelo RVA seja significativamente maior em animais com até 30 dias de idade (ALFIERI et al., 2006), neste surto, cinco animais mais velhos foram afetados, incluindo um animal com 116 dias de idade (Apêndice B). Em humanos, Atchison et al. (2010) relatam que na Europa os surtos de diarreias ocasionados pelo RV registram-se no final do inverno e início da primavera, sugerindo que a sazonalidade da infecção possa estar relacionada com os fatores meteorológicos. No presente estudo, na avaliação diária dos indicadores climáticos, foi observada uma variação expressiva na precipitação pluviométrica. Nos seis dias que antecederam o surto, a precipitação foi quatro vezes maior do que a observada durante todo o mês de setembro e outubro (Tabela 12). Freitas et al. (2011) também relataram a maior prevalência de RV em rebanhos leiteiros do estado de São Paulo no período de chuvas, atribuindo ao fato às práticas higiênicas mais deficientes. Na propriedade de Mariluz a higiene ambiental é bastante precária, sendo comum o acúmulo de dejetos nas instalações de permanência dos animais. O grande volume de chuvas registrado na época do surto pode ter contribuído para a dispersão do vírus nos espaços compartilhados por animais de diferentes faixas etárias, facilitando assim o ciclo de transmissão do RV.



A umidade relativa do ar se manteve próxima de 55% ao longo dos seis dias que antecederam o início do surto. Sattar et al. (1984), em uma pesquisa sobre a viabilidade do RV aerossolizado em diferentes umidades relativas sob controle, constatou a umidade de 50% ( $\pm 5$ ) como ótima para sobrevivência do vírus em suspensão (meia vida de 40 horas). Esta constatação poderia constituir mais uma condição favorável para o desencadeamento do surto descrito. Entretanto, a transmissão do RV é bastante complexa e a análise isolada de fatores climáticos não é suficiente para elucidar a epidemiologia das rotaviroses.

Em relação aos resultados de genotipagem de RVA não foi possível estabelecer uma comparação de frequências de G e P e suas combinações devido ao insucesso na amplificação genômica de diversas amostras submetidas à RT-PCR. As possíveis falhas continuam sendo investigadas e novas experimentações estão sendo conduzidas para esta conclusão. Desta forma, os resultados aqui apresentados são preliminares e podem representar apenas parcialmente os genótipos de RVA circulantes na propriedade leiteira de Mariluz entre os anos de 2012 e 2014. Foi possível a determinação do genótipo G (gene VP7) em oito amostras analisadas, das quais cinco foram identificadas como G6 e três amostras como G10. Em relação ao genótipo P (gene VP4), duas amostras foram compatíveis com P[11] e outras duas com P[5]; nas demais amostras não foi possível a determinação de P (P[X]). Os genótipos encontrados na propriedade são descritos como os mais prevalentes na espécie bovina tanto no Brasil quanto em outros países (FALCONE et al., 1999; EL-ATTAR et al., 2002; BARREIROS et al., 2004; GARAIKOECHEA et al., 2006). Caruzo et al. (2010) encontraram uma predominância do genótipo G6 com 64,5%, seguido de 32,2% de G10 em um estudo de caracterização molecular em amostras fezes coletadas entre 1994 e 1995 no estado de Goiás. Buzinaro et al. (2009), relataram a predominância do genótipo G6 em 61,1% das amostras durante os anos de 2003 e 2004 no estado de São Paulo.

Considerando as combinações dos genes VP7/VP4 foram detectadas em duas amostras o genótipo G10P[11], além de outras duas sendo caracterizadas como genótipo G6P[5]. Essas combinações também são descritas na literatura como as mais frequentes na espécie bovina em diversos países (HUSSEIN et al., 1993; FUKAI et al., 1999; GHOSH et al., 2008). A predominância de G6P[5] é relatada na Austrália, Irlanda, França e Argentina (SWIATEK et al., 2010; CASHMAN et al., 2010; BADARACCO et al., 2012; KAPLON et al., 2013). Em pesquisa

semelhante, o G6P[5] foi classificado como a combinação mais prevalente, presente em 40% das amostras coletadas de rebanhos no sul, sudeste e nas regiões centrais do Brasil entre 1996 e 1999 (ALFIERI et al., 2006).

Na análise dos genótipos de acordo com o período de estudo, somente duas amostras de RVA detectadas no período que antecedeu a vacinação materna (maio de 2012 a janeiro de 2013) foram genotipadas, com a identificação do genótipo G6 porém com P tipo indefinido (P[X]). Entretanto, devido ao pequeno número de amostras genotipadas não se pode afirmar categoricamente que G6 era o único genótipo circulante na propriedade no período que antecedeu a vacinação.

Nas amostras de RVA detectadas em animais no período de estudo que compreendeu a primovacinação materna, além do genótipo G6 foram detectados os genótipos G10, P[5] e P[11]. Entretanto, G10 e P[11] foram identificados apenas nas fezes dos animais nascidos de mães submetidas ao protocolo completo de vacinação. Os RVA detectados em bezerros das mães que receberam protocolo incompleto foram caracterizados como G6P[5] ou G6P[X], e aquele correspondente ao bezerro da mãe não vacinada foi G6P[5] (Tabela 14).

De posse dessas informações observou-se que a vacina utilizada contendo os genótipos G6 e G10 não foi capaz de prevenir a infecção pelo RVA nem mesmo nos bezerros nascidos das vacas com protocolo completo de vacinação. Inclusive, o mesmo genótipo constituinte da vacina (G10) foi detectado nas fezes dos animais infectados, não conferindo proteção contra um genótipo homólogo. Uma vez que a vacinação contra o RVA é uma prática pouco comum nos rebanhos bovinos brasileiros, os trabalhos relacionados aos genótipos de RVA circulantes em rebanhos vacinados e não vacinados são incipientes. No Brasil, o único trabalho existente foi desenvolvido por Barreiros et al., (2004) em rebanhos de corte e leite do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná. Neste, os autores detectaram os genótipos clássicos em rebanhos não vacinados, G6[P1], G8[P1] e G6[P5]. Em contrapartida, nos rebanhos vacinados os genótipos G6 e P[11] foram os predominantes. Vale ressaltar que a vacina relatada por Barreiros et al. (2004) era monovalente constituída pela amostra NCDV G6P[1] inativada, diferente do presente estudo (multivalente inativada, sorótipos G6 e G10). Além disso, contrário aos nossos achados, o genótipo G10P[11] não foi detectado em nenhuma amostra. Barreiros et al. (2004) sugerem que o desaparecimento do genótipo P[1] possa estar relacionado com a imunidade homotípica conferida pela vacina. No entanto, com a

continuidade da circulação do genótipo G6, constituinte da vacina, em rebanhos vacinados, os autores sugerem que a resposta imune contra o vírus vacinal possa ser mais eficiente contra a proteína VP4 do que contra VP7, independente do genótipo associado. Os resultados de genotipagem aqui apresentados são ainda preliminares seria precoce e imatura qualquer conclusão acerca do impacto da circulação de genótipos do RVA nos diferentes períodos de estudo.

Até o nosso conhecimento este é o primeiro estudo epidemiológico longitudinal prospectivo para avaliação da incidência do RVA em um rebanho leiteiro endemicamente infectado após a introdução da vacinação materna.

A alta frequência de detecção do RVA encontrada demonstrou que a imunização materna, quando adotada sem a correção de possíveis fatores de risco envolvidos, não constituiu fator de proteção para a população de risco. Além disso, ao menos no primeiro ano de vacinação, a medida poderá representar um aumento de custo para o produtor.

## 7 CONCLUSÕES

- A presença do rotavírus A (RVA) nas fezes de bezerros foi eficientemente comprovada pela EGPA demonstrando a efetiva participação deste enteropatógeno nos casos de diarreia neonatal na propriedade leiteira de base familiar do Noroeste do Paraná;
- A avaliação comparativa dos indicadores epidemiológicos entre os dois períodos de estudo (antes e após a introdução da vacina), indicou que a primovacinação materna não reduziu a infecção pelo RVA, mas apresentou uma tendência à redução da mortalidade e letalidade em condições naturais a campo;
- Embora a frequência de detecção do RVA no grupo de animais nascidos das fêmeas com protocolo de vacinação completo tenha sido menor que no grupo das não vacinadas e com protocolo incompleto de imunização, esta diferença não apresentou significância estatística;
- A maior frequência de RVA foi encontrada em animais com sete dias de idade ( $p < 0,05$ ), apresentando um risco de infecção de 2,63 a 9,20 vezes maior do que nos animais com 14 e 21 dias, respectivamente.
- A condição de paridade das fêmeas não constituiu um fator determinante para a frequência de RVA;
- As variações na frequência de detecção do RVA foram diretamente proporcionais às variações da temperatura mínima e precipitação pluviométrica na distribuição por estação do ano. As maiores frequências foram encontradas durante o outono e a primavera. O inverno foi a estação climática com o menor número de casos positivos, coincidindo com os menores índices de temperatura mínima e precipitação pluviométrica;
- A frequência de RVA não foi associada às temperaturas mínimas ou baixas precipitações pluviométricas na propriedade avaliada.
- A genotipagem identificou os genótipos G6, G10, P[5] e P[11] e as combinações G10P[11] e G6P[5] de RVA circulantes na propriedade. Os

resultados preliminares sugeriram que a vacinação não protegeu os bezerros contra infecção com RVA homólogo (G10).

## 8 REFERÊNCIAS

- ACRES, S. D. Enterotoxigenic *E. coli* infections in newborn calves: a review. **J Dairy Sci**, v. 68, n. 1, p. 229–256, jan. 1985.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; BEUTTEMÜLLER, E. A.; BRITO, B. G.; MÉDICI, K. C. Aspectos epidemiológicos da rotavírose suína na região sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Sem Ciênc Agrár**, Londrina, v. 20, n.1, p. 5-11, mar. 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. **Trop Anim Health Prod**, v. 38, n. 7-8, p. 521-526, oct. 2006.
- ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; TAKIUCHI, E.; LOBATO, Z. I. P. Reoviridae. In: FLORES, E.F. (Org.). **Viol Vet**. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p. 775-807.
- ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A.; BARREIROS, M. A. B.; LEITE, J. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Vet Microbiol**, v. 99, n. 3-4, p.167-173, apr. 2004.
- ALKAN, F.; OZKUL, A.; OGUZOGLU, T. C.; TIMURKAN, M. O.; CALISKAN, E.; MARTELLA, V.; BURGU, I. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. **Vet Microbiol**, v. 141, n. 3-4, p. 231-237, mar. 2010.
- ATCHISON, C. J.; TAM, C. C.; HAJAT, S.; VAN PELT, W.; COWDEN, J. M.; LOPMAN, B. A. Temperature-dependent transmission of rotavirus in Great Britain and The Netherlands. **Proc Royal Soc B: Biol Sci**, v. 277, p. 933 – 942, abr. 2010.
- AZIZZADEH, M. Characterisation and pattern of culling in Holstein-Friesian dairy herds in Khorasan Razavi Province, Northeast of Iran. **Vet Res Forum**, v. 2, n. 4, p. 254-258, set. 2011.
- BACHMANN, P. A. Neue virale Durchfallerkrankungen beim kalb. **Tierärztl Umsch**, v. 10, p. 524-526, 1977.
- BADARACCO, A.; GARAI COECHEA, L.; RODRIGUEZ, D.; URIARTE, E. L.; ODEON, A.; BILBAO, G. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. **Vet Microbiol**, v. 158, n. 3-4, p. 394–399, aug. 2012.
- BARBOSA, E. F.; FIGUEIREDO, H. C. P.; GARCIA, A. M.; LOBATO, Z. I. P.; LAGE, A. P. Rotavírus do grupo A em bezerros lactentes no estado de Minas Gerais. **Ciênc Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 3, p. 435-439, jul.-sep. 1988.

BARREIROS, M. A. B.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, K. C.; LEITE, J. P. G.; ALFIERI, A. A. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. **J Vet Med**, v.51, n.3, p.104-109, apr. 2004.

BARTELS, C. J.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W. A.; LAM, T. J. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young dutch dairy calves. **Prev Vet Med**, v. 93, n. 2-3, p. 162-169, feb. 2010.

BEARDS, G. M. Polymorphism of genomic RNAs within rotavirus serotypes and subgroups. **Arch Virol**, v.74, n.1, p. 65-70, 1982.

BIOGENESIS, 2014. Disponível em: <<http://www.biogenesisbago.com/br/vademecum.php?idlinha=30&linha=Biol%C3%B3gica>>. Acesso em: 10 maio 2014.

BONADUCE, L. M. Bovine diarrhea and a longitudinal survey on aetiology viruses agents. **Vet Record**, v. 23, p. 45-49, 1990.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-van DILLEN, P. M. E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, Washington, v.28, n.3, p.495-503, mar. 1990.

BRANDÃO, P. E.; VILLARREAL, L. Y. B.; SOUZA, S. L. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; JEREZ, J. A. Mixed infections by bovine coronavirus, rotavirus and *Cryptosporidium parvum* in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v. 74, p. 33-34, jan./mar. 2007.

BRIDGER, J. C. Non-group A rotaviruses. In: KAPIKIAN, A.Z. **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 369–407.

BRITO, W. M. E. D. Bovine rotavirus in the State of Goiás. **Ver Microbiol**, v. 24, p. 229-234, 1994.

BUZINARO, M. G.; MUNFORD, V.; BRITO, V. M. E. D.; RÁCZ, M. L.; JEREZ, J. A. Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arq Brasil Med Vet Zootec**, Belo Horizonte, v. 52, n.6, p. 555-561, dez. 2000.

BUZINARO, M. G.; MISTIERI, M. L. A.; CARVALHO, A. A. B.; SAMARA, S. I.; REGITANO, L. C. A.; JEREZ, J. A. Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. **Arq Brasil Med Vet Zootec**, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 266-270, jun. 2003.

BUZINARO, M. G.; SAMARA, S. I.; PEREIRA, E. A. S.; FUENTES, D. B.; OLIVEIRA, M. C. S. Ocorrência dos genótipos G e P de rotavírus do grupo A em bezerros de rebanhos de corte no estado de São Paulo, Brasil. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v.76, n.1, p.99-105, jan./mar. 2009.

CARDOSO, D. D.; SOARES, C. M.; SOUZA, M. B.; AZEREDO, M. S.; MARTINS, R. M.; QUEIROZ, D. A.; BRITO, W. M.; MUMFORD, V.; RÁCZ, M. L.; QUEIROZ, D. A.

Epidemiological Features of Rotavirus Infection in Goiânia, Goiás, Brazil, from 1986 to 2000. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 1, p. 25-29, jan. 2003.

CARUZO, T. A.; BRITO, W. M.; MUNFORD, V.; RACZ, M. L. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from goias, brazil: high frequency of mixed p-type infections. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, n. 8, p. 1040-1043, dec. 2010.

CASHMAN, O.; LENNON, G.; SLEATOR, R. D.; POWER, E.; FANNING, S.; O'SHEA, H. Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009. **Vet Microbiol**, v. 146, n. 3-4 p. 238–244, dec. 2010.

CASTRUCCI, G.; FRIGERI, F.; FERRARI, M.; ALDROVANDI, V.; TASSINI, F.; GATTI, R. The protection of newborn calves against experimental rotavirus infection by feeding mammary secretions from vaccinated cows. **Microbiologica**, v. 11, n. 4, p. 379–385, oct. 1988.

CHAUHAN, R. S.; SINGH, N. P. Epidemiology of rotavirus infection in calves. **Intern J Anim Sci**, v. 11, p. 221-223, 1996.

CHIGERWE M.; TYLER, J. W.; SUMMERS, M. K.; MIDDLETON, J. R.; SCHULTZ, L. G.; NAGY, D. W. Evaluation of factors affecting serum IgG concentrations in bottle-fed calves. **J Am Vet Med Assoc**, v. 234, p. 785-789, mar. 2009.

CORNAGLIA, E. M.; FERNANDEZ, F. M.; GOTTSCHALK, M. Reduction in morbidity due to diarrhea in nursing beef calves by use of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus-Escherichia coli vaccine in the dam. **Vet Microbiol**, v. 30, n. 2-3, p. 191-202, mar. 1992.

DESSELBERGER, U. Molecular epidemiology of rotaviruses. In: FARTHING, M. J. G. (Ed.). **Viruses and the gut**. London: Swan, 1989. p. 55-69.

DESSELBERGER, U.; ITURRIZA-GOMARA, M.; GRAY, J. Rotavirus epidemiology and surveillance. In: Novartis Foundation Symposium, 2001. **Anais...[SI]**: Novartis, 2001, v. 238, p.125- 127.

DHAMA, K.; CHAUHAN, R. S.; MAHENDRAN, M.; MALIK, S. V. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Vet Res Com**, v. 33, n.1, p. 1-23, jan. 2009.

DIEESE (2011) **Estatísticas do meio rural 2010-2011**. 4. ed. São Paulo: DIEESE, NEAD, MDA, 2011. 292p.

DONOVAN, G. A.; DOHOO, I. R.; MONTGOMERY, D. M.; BENNETT, F. L. Calf and disease factors affecting growth in female holstein calves in florida, USA. **Prev Vet Med**, v. 33, n. 1-4, p. 1-10, jan. 1998.

EL-ATTAR, L.; DHAILWAL, W.; GOMARA, M. I.; BRIDGER, J. C. Identification and molecular characterisation of a bovine G3 rotavirus which causes age-independent diarrhea in cattle. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 3, p. 937–942, mar. 2002.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virol**, 3. ed., New York: Raven Press, 1996. p.1625-1655.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virol**. 4. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p.1747-1785.

ESTES, M.K.; KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.) **Fields Virol**. 5. ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p.1918-1974.

FALCONE, E.; TARANTINO, M.; TRANI, L. D.; CORDIOLI, P.; LAVAZZA, A.; TOLLIS, M. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. **J Clin Microbiol**, v. 37, n. 12, p. 3879–3882, dec. 1999.

FEITOSA, F. L. F.; BORGES, A. S.; BENESI, F. J.; BIRGEL, E. H.; MENDES, L. C. N.; PIERO, J. R. Concentração de imunoglobulinas G e M no soro sanguíneo de bezerros da raça Holandesa até os 90 dias de idade. **Brazil J Vet Res Anim Sci**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 26-31, sep. 2003. Suplemento1.

FIJTMAN, N. L.; BARRANDE GUY, M. E.; CORNAGLIA, E. M.; SCHUDEL, A. A. Variations and persistency of eletropherotypes of bovine rotavirus field isolates. **Arc Virol**, v.96, n.3-4, p.275-281, sep. 1987.

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. **Arq Bras Med Vet Zootec**, Belo Horizonte, v. 63, n. 4, p. 820-827, dez. 2011.

FUKAI, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOU, T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. **Vet Microbiol**, v.66, n.4, p.301-311, may. 1999.

FUKAI, K.; MAEDA, Y.; FUJIMOTO, K.; ITOU, T. K.; SAKAI, T. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. **Vet Microbiol**, v.86, n.4, p.343-349, may. 2002.

GARAICOECHEA, L.; BOK, K.; JONES, L. R.; COMBESSIES, G.; ODEON, A.; FERNANDEZ, F.; PARRENO, V. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in argentina during a 10-year period (1994-2003). **Vet Microbiol**, v. 118, p. 1-11, nov. 2006.

GARCIA-SANCHEZ, J.; CORRAL, C.; HALAIHEL, N. G.; SIMON, M. C.; ALONSO, J. L.; MUZQUIZ, J. L.; ORTEGA, C.; GIRONES, O. Survey of rotavirus infection in a dairy herd: comparison between polyacrylamide gel electrophoresis and two commercial tests. **Vet Microbiol**, v. 34, p. 321-332, 1993.

GAY, C. C.; HODGSON, J. C.; LOFSTEDT, J.; BOLIN, S. R. **Diarrhea in neonatal ruminants: intestinal diseases in ruminants**: MERCK VETERINARY MANUAL, 2012. Disponível em: <[http://www.merckmanuals.com/vet/print/digestive\\_system/intestinal\\_diseases\\_in\\_ruminants/diarrhea\\_in\\_neonatal\\_ruminants.html](http://www.merckmanuals.com/vet/print/digestive_system/intestinal_diseases_in_ruminants/diarrhea_in_neonatal_ruminants.html)>. Acesso em: 10 dez. 2013.



GENTSCH, J. R.; GLASS, R. I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B. K.; BHAN, M. K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, v.30, n.6, p.1365-1373, jun. 1992.

GENTSCH, J. R.; ALFIERI, A. A.; LEITE, J. P. G.; NAKAGOMI, O.; KAGA, E.; WOODS, P. A.; GLASS, R. I. Characterization of human rotavirus genotype P[8]G5 from Brazil by Probe-Hybridization and Sequence. **Arc Virol**, v.141, p. 2353-2364, dec. 1996.

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; SINHA, M.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T. N. Molecular characterization of bovine group A rotavirus G3P[3] strains. **Arc Virol**, v. 152, p. 1935-1940, aug. 2007.

GHOSH, S.; SAMAJDAR, S.; SINHA, M.; KOBAYASHI, N.; TANIGUCHI, K.; NAIK, T. N. Molecular characterization of rare bovine group A rotavirus G15P[11] and G15P[21] strains from eastern India: identification of simian SA11-like VP6 genes in G15P[21] strains. **Vir Genes**, v.37, n. 2, p. 241-249, oct. 2008.

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

HEIDE, R. V.; KOOPMANS, M. P. G.; SHEKARY, N.; HOUWERS, D. J.; VAN DUYNHOVEN, Y. T. H. P.; van der POEL, W.H.M. Molecular characterization of human and animal group A rotaviruses in the Netherlands. **J Clin Microbiol**, n. 43, v. 2, p. 669-675, feb. 2005.

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. **J Clin Microbiol**, v. 16, n. 3, p. 473-477, sep. 1982.

HUANG, J. A.; NAGESHA, H. S.; SNODGRASS, D. R.; HOLMES, I. H. Molecular and serological analyses of two rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. **J Clin Microbiol**, v. 30, n. 1, p. 85-92, jan. 1992.

HUSSEIN, H. A.; FROST, E.; TALBOT, B.; SHALABY, M.; CORNAGLIA, E.; EL-AZHARY, Y. Comparison of polymerase chain reaction and monoclonal antibodies for G-typing of group A bovine rotavirus directly from fecal material. **Vet Microbiol**, v.51, n.1-2, p.11-17, aug. 1996.

IBGE (2006) - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2006**: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro, 2006. Censo Agropecuário. p.1-777.

IBGE (2012) - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2012**: Pesquisa Agrícola Municipal (PAM — 2012). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br> Acesso em: dez/2013>.

ICTV. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: King, A.M.Q.; Adams, M.J.; Carstens, E.B.; Lefkowitz, E.J. (Eds.). **Ninth Report of the**

**International Committee on Taxonomy of Viruses.** San Diego: Elsevier Academic Press, 2012.

IPARDES – Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná:** Sumário Executivo. Curitiba: IPARDES. 2009. 29 p.

ISHIZAKI, H.; SAKAI, T.; SHIRAHATA, T.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S.; GOTO, H. The distribution of G and P types within isolates of bovine rotavirus in Japan. **Vet Microbiol**, v. 48, n. 3-4, p. 367-372, feb. 1996.

IZZO, M. M.; KIRKLAND, P. D.; MOHLER, V. L.; PERKINS, N. R.; GUNN, A. A.; HOUSE, J. K. Prevalence of major enteric pathogens in australian dairy calves with diarrhoea. **Aust Vet J**, v. 89, n. 5, p. 167-73, mai. 2011.

JAKOBSSON S. **Diagnosis and Molecular Epidemiology of Bovine Rotavirus and Coronavirus in Brazil:** Second cycle, A2E. Uppsala: SLU, Dept. of Biomedical Sciences and Veterinary Public 2013. Disponível em: <<http://epsilon.slu.se>>. Acesso em: 25 jan. 2014.

JANKE, B. H. Symposium on neonatal calf diarrhoea. **Vet Med**, v.84, p. 803-810, 1989.

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 diarreia criados em vários municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Arq Inst Biol**, São Paulo, v. 69, p.19-23, abr./jun. 2002.

KANEENE, J. B.; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Prev Vet Med**, v. 8, n. 2-3, p. 127-140, 1990.

KAPIKIAN, A. Z. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea in infants and young children: An introduction. In: **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract**, 2. ed., New York: Marcel Dekker, 1994. p. 409-417.

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY P. M.; GRIFFIN, D.E. et al. (Ed.). **Virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1787-1833.

KAPLON, J.; FREMY, C.; BERNARD, S.; REHBY, L.; AHO, S.; POTHIER, P.; AMBERT-BALAY, K. Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. **Vaccine**, v. 31, n. 20, p. 2433-2440, may 2013.

KHARALAMBIEV, K. H.; GEORGIEV, G. K.; MITOV, B. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting rotavirus. **Vet Bulletin**, v. 53, p. 5274, 1983.

KOHARA, J.; HIRAI, T.; MORI, K.; ISHIZAKI, H.; TSUNEMITSU, H. Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea. **J Vet Med Sci**, v. 59, p. 1023-1025, nov. 1997.

LORENZ, I.; FAGAN, J.; MORE, S. J. Calf health from birth to weaning. II. Management of diarrhoea in pre-weaned calves. **Ir Vet J**, v. 64, n. 1, p. 9, sep. 2011.

LORENZ, I.; MEE, J. F.; EARLY, B.; MORE, S. J. Calf health from birth to weaning. I. General aspects of disease prevention. **Ir Vet J**, v. 64, n. 1, p. 14. oct. 2011

LUCCHELLI, A.; LANCE, S. E.; BARTLETT, P. B.; MILLER, G. Y.; SAIF, L. J. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **Am J Vet Res**, v. 53, n. 2, p. 169-174, feb. 1992.

MALIK, Y. S.; SHARMA, K.; VAID, N.; CHAKRAVARTI, S.; CHANDRASHEKAR, K. M.; BASERA, S. S.; SINGH, R.; MINAKSHI, PRASAD, G.; GULATI, B. R.; BHILEGAONKAR, K. N.; PANDEY, A. B. Frequency of group a rotavirus with mixed g and p genotypes in bovines: predominance of g3 genotype and its emergence in combination with G8/G10 types. **J Vet Sci**, v. 13, n.3, p. 271, sep. 2012.

MANZULLO, A. Etiopatogenia de las diarreas de los animales domésticos. **R Méd Vét**, v.66, p.252-263, 1985.

MARKOWSKA-DANIEL, I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSKAK, Z. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infectious in piglets. **Comp Immunol Microbiol Infec Dis**, v.19, n.3, p.219-232, 1996.

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

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P. H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER U.; VAN RANST M.; JOHNE R. VP6 sequence-based cut-off values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Arc Virol**, v. 157, n. 6, p. 1177-82, jun. 2012.

McNULTY, M. S.; LOGAN, E. F. Effect of vaccination of the dam on rotavirus infection in young calves. **Vet Record**, v. 120, p. 250-252, mar. 1987.

MIDGLEY, S. E.; BÁNYAI, K.; BUESA, J.; HALAIHEL, N.; HJULSAGER, C. K.; JAKAB, F.; KAPLON, J.; LARSEN, L. E.; MONINI, M.; POLJSKAK-PRIJATELJ, M.; POTHIER, P.; RUGGERI, F. M.; STEYER, A.; KOOPMANS, M.; BOTTIGER, B. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. **Vet Microbiol**, v. 156, n. 3-4, p. 238-245, may. 2012.

MOHD NOR, N.; STEENEVELD, W.; MOURITS, M. C.; HOGEEVEEN, H. Estimating the costs of rearing young dairy cattle in the netherlands using a simulation model that accounts for uncertainty related to diseases. **Prev Vet Med**, v. 106, n. 3-4, p. 214-24, oct. 2012.

MOLINARI, B. L. D.; LORENZETTI, E.; OTONEL, R. A. A.; ALFIERI A. F.; AMAURI A. A. Species H Rotavirus Detected in Piglets with Diarrhea, Brazil, 2012. **Emerg Infect Dis**, v. 20, n. 6, p. 1019-1022, jun. 2014

MOORE, D. Symposium on neonatal calf diarrhea. **Vet Med**, v. 84, p. 793, 1989.

MORTEO, C. G.; AWJA, A. S.; ESTRELLA, S. G. Estudio etiológico de los problemas diarreicos en becerros lactentes. **Vet Mex**, v. 21, n. 4, p. 435-438, 1990.

MSD, 2014. Disponível em: <<http://www.msd-saude-animal.com.br/products/BOVILISTRIGUARD/020ResumodaBula.aspx>>. Acesso em: 10 maio 2014.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINECK, M. C.; STUDDERT, M. J. Reoviridae. In: **Vet Virol**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 1999. p. 391.

OKADA, N.; MATSUMOTO, Y. Bovine rotavirus G and P types and sequence analysis of the VP7 gene of two G8 bovine rotaviruses from Japan. **Vet Microbiol**, v.84, n. 4, p.297-305, mar. 2002.

PAUL, P. S.; LYOO, Y. S. Immunogens of rotaviruses. **Vet Microbiol**, v. 37, p. 299-317, nov. 1993.

PEDLEY, S.; BRIDGER, J. C.; CHASEY, D.; Mc-CRAE, M. A. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. **J Gen Virol**, v. 67, p. 131-137, jan. 1986.

PEREIRA, H. G.; AZEREDO, R. S.; LEITE, J. P. G.; CANDEIAS, J. A. N.; RACZ, M. L.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y. B.; TRABULSI, J.R. Eletrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Belém, Brazil. **J Hyg**, v. 90, p. 117-125, 1983.

PEREIRA, H. G.; AZEREDTO, R. S.; SUTMOLLER, F.; LEITE, J. P.; FARIAS, V. D. E.; BARTH, O. M.; VIDAL M. N. P. Comparasion of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 4, p. 483-490, oct./dec.1983.

PISANELLI, G.; MARTELLA, V.; PAGNINI, U.; MARTINO, L. D.; LORUSSO, E.; IOVANE, G.; BUONAVOGLIA, C. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes in buffalo group A rotaviruses isolated in Southern Italy. **Vet Microbiol**, v.110, n.1-2, p.1-6, out. 2005.

PRASAD, B. V. V.; CHIU, W. Structure of rotavirus. In: RAMIG, R. F. (Ed.). **Cur Top Microbiol Immunol**, v.185, 1994. p.1-27.

REIDY, N.; LENNON, G.; FANNING, S.; POWER, E.; O'SHEA, H. Molecular characterization and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002–2004. **Vet Microbiol**, v.117, n.2-4, p.242-247, oct. 2006.

REINHARDT, G.; RIEDEMANN, S.; POLETTE, M.; AGUILAR, M.; NIEDDA, M. Diarrea neonatal: Infeccion por rotavirus en bovinos y porcinos. **Arc Vet Med**, v. 18, p. 23-27, 1986.

RODRÍGUEZ-LIMA, W. A.; FLORES-SAMANIEGO, B.; DE LA MORA, G.; RAMÍREZ, O. T.; PALOMARES, L. A. Genotypification of bovine group A rotavirus in México. **Vaccine**, v.27, n.46, p.6411-6414, oct. 2009.

SAIF, L. J. Nongroup A rotavirus. In: SAIF, L.J.; THEIL, K.W. (Ed.), **Viral diarrheas of man and animals**. New York: CRC Press, 1990. p. 73-95

SAIF, L. J., JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. In: RAMIG, R. F. (Ed.) **Rotaviruses**. Berlin: Springer-Verlag, v. 185, 1994. p. 339-371.

SAIF L. J.; FERNANDEZ F. M. Group A rotavirus veterinary vaccines. **J Infec Dis**, v.174, p. 98-106, set. 1996. Suplemento1.

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

SATTAR, S. A.; IJAZ, M. K.; JOHNSON-LUSSENBURG, C. M.; SPRINGTHORPE, V. S. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavírus SA11. **Appl Environ Microbiol**, v. 47, n. 4, p. 879-881, apr. 1984.

SILVA, D. G.; MONTASSIER, H. J.; OLIVEIRA, R. G.; FUENTES, D. B.; SAMARA, S. I.; JEREZ, J. A.; BUZINARO, M. G. Avaliação da imunidade passiva em bezerros nascidos de vacas imunizadas com vacina contra rotavírus. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 60, n. 5, p. 1089-1096, out. 2008.

SNODGRASS, D. R.; FAHEY, K. J.; WELLS, P. W.; CAMPBELL, I.; WHITELOW, A. Passive immunity in calf rotavirus infections: maternal vaccination increases and prolongs immunoglobulin G1 antibody secretion in milk. **Infec Immun**, v. 28, p. 344-349, may. 1980.

SNODGRASS, D. R.; TERZOLO, H. R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J. D.; SYNGE, B. A. A etiology of diarrhoea in young calves. **Vet Record**, v.119, n. 2, p.31-34, 1986.

SNODGRASS, D. R. Evaluation of a combined rotavirus and enterotoxigenic Escherichia coli vaccine in cattle. **Vet Record**, v. 119, p. 39-43, jul. 1986.

SNODGRASS, D. R.; FITZGERALD, T.; CAMPBELL, I.; SCOTT, F. M. M.; BROWNING, G. F.; MILLER, D. L.; HERRING, A. J.; GREENBERG, H. B. Rotavirus Serotypes 6 and 10 Predominate in Cattle. **J Clin Microbiol**, v. 28, n.3, p. 504-507, mar. 1990.

STIPP, D. T.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A. F.; TAKIUCHI, E.; AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. **Trop Anim Health Prod**, v.41, n. 7, p. 1563-1567, apr. 2009.

SWIATEK, D. L.; PALOMBO, E. A.; LEE, A.; COVENTRY, M. J.; BRITZ, M. L.; KIRKWOOD, C. D. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. **Vet Microbiol**, v. 140, n. 1-2, p. 56-62, jan. 2010.

TORSEIN, M.; LINDBERG, A.; HALLÉN SANDGREN, C.; PERSSON WALLER, K.; TÖRNQUIST, M.; SVENSSON, C. Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds. **Prev Vet Med**, v. 99, p. 136-147, may. 2011.

TZIPORI, S. The relative importance of enteric pathogens affecting neonates of domestic animals. **Adv Vet Sci Comp Med**, v. 29, p. 103–206, 1985.

UTRERA, V.; DE ILJA, R. M.; GORZIGLIA, M.; ESPARZA, J. Epidemiological aspects of porcine rotavirus infection in venezuela. **Res Vet Sci**, v. 36, n. 3, p. 310-315, may. 1984.

VENDE, P.; KAROUM, R.; MANET, G.; RIZET, C.; SCHELCHER, F.; COHEN, J.; NAVET, H. Molecular epidemiology of bovine rotaviruses from the Charolais area. **Vet Res**, v. 30, p. 451-456, 1999.

WAKUDA, M.; IDE, T.; SASAKI, J.; KOMOTO, S.; ISHII, J.; SANEKATA, T.; TANIGUCHI, K. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. **Emerg Infec Dis**, v. 17, p. 1491-1493, aug. 2011.

WALTNER-TOWES, D.; MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; MCMILLAN, I.; CROUCH, C. F.; A field trial to evaluate the efficacy of a combined rotavirus-coronavirus/ Escherichia coli vaccine in dairy cattle. **Canadian J Comp Med**, v. 49, p. 1-9, jan. 1985.

WILSON, H. L. et al. Molecular analyses of disease pathogenesis: application of bovine microarrays. **Vet Immun Immunopathol**, Amsterdam, v. 105, n. 3-4, p. 277-287, mai. 2005.

WOODE, G.N. Viral diarrhea in calves. **Veterinary Annual**, v. 16, p. 30–34, 1976.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 2. Ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1996. 662p.

ZOETIS, 2014. Disponível em: <<http://www.zoetis.com.br/Produtos-e-Servicos/Bovinos/Informacoes-tecnicas/scourguard4KC.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2014.

**Apêndice A:** Comparação dos coeficientes de morbidade por rotavírus (RV), mortalidade por diarreia, mortalidade específica e letalidade antes e após a introdução da vacinação materna na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná (2012-2014).

Variáveis epidemiológicas	Período de estudo		Indicadores epidemiológicos			
	Antes vacinação maio/2012 a jan/2013	Após vacinação mar/2013 a jan2014	$\chi^2C$	p<0,05	OR (IC)	RR (IC)
Morbidade por RV	12 (39%)	33 (52%)	1,0565	0,3040	0,5742 (0,24-1,38)	0,7390 (0,45-1,22)
Mortes por diarreia	6 (19%)	7 (11%)	0,5940	0,4409	1,9200 (0,58-6,30)	1,7419 (0,64-4,74)
Mortes por RV	4 (13%)	5 (8%)	0,1573	0,6917	1,7185 (0,43-6,91)	1,6258 (0,47-5,63)
Mortes letais por RV	4 (33%)	5 (15%)	0,8594	0,3538	2,800 (0,61-12,95)	2,2000 (0,71-6,86)

$\chi^2C$ = qui-quadrado corrigido de Yates; OR=*Odds Ratio*; RR=Risco relativo; IC=Intervalo de confiança de 95%

## Apêndice B: Relação dos animais avaliados no período de estudo após a introdução da vacinação na propriedade leiteira de Mariluz, Paraná.

Identificação bezerro(a) (nome da mãe)	PARTO FÊMEA	Data de nascimento bezerro(a)	Sexo	Raça	Coleta 7° dia	Coleta 14° dia	Coleta 21° dia	Protocolo da Primovacinação	Resultado EGPA	Morte do animal	Outros*
Chifrinha	3°	12/03/2013	F	Jersey Holando	<b>19/03/2013</b>	26/03/2013	02/04/2013	Incompleto	positivo	não	G6P[X]
Joaninha	1°	03/04/2013	M	Gir	<b>10/04/2013</b>	sem coleta	sem coleta	não vacinada	positivo	sim	-
Tiazinha	4°	04/04/2013	F	Jersey Holando	<b>11/04/2013</b>	18/04/2013	25/04/2013	completo	positivo	não	-
Revolução	3°	07/04/2013	F	Jersey Holando	<b>14/04/2013</b>	21/04/2013	28/04/2013	completo	positivo	sim	-
Cabrita	5°	15/04/2013	M	Girolando	22/04/2013	29/04/2013	06/05/2013	completo	negativo	não	-
Manhosa	1°	29/04/2013	F	Girolando	<b>06/05/2013</b>	13/05/2013	20/05/2013	Incompleto	positivo	não	-
Paulista	5°	03/05/2013	M	Girolando	<b>10/05/2013</b>	17/05/2013	24/05/2013	completo	positivo	não	G10P[11]
Mancinha	4°	03/05/2013	M	Jersey Holando	<b>10/05/2013</b>	17/05/2013	24/05/2013	Incompleto	positivo	não	-
Chifrim 3peito	4°	04/05/2013	F	Gir/Jersey	<b>11/05/2013</b>	18/05/2013	25/05/2013	completo	positivo	não	G10P[11]
Jersey 3 peito	5°	04/05/2013	M	Gir/Jersey	<b>11/05/2013</b>	18/05/2013	25/05/2013	completo	positivo	não	-
Chita doida	6°	18/05/2013	M	Girolando	25/05/2013	<b>01/06/2013</b>	08/06/2013	completo	positivo	não	G10P[X]
Mancinha ja	4°	18/05/2013	M	Jersey Holando	25/05/2013	01/06/2013	08/06/2013	não vacinada	negativo	não	-
Roseira	4°	20/05/2013	F	Girolando	<b>27/05/2013</b>	03/06/2013	10/06/2013	completo	positivo	não	-
Guaíra	1°	22/05/2013	M	Girolando	29/05/2013	05/06/2013	12/06/2013	Incompleto	negativo	não	-
Curuíra	1°	25/05/2013	F	Jersey Holando	<b>01/06/2013</b>	08/06/2013	15/06/2013	Incompleto	positivo	não	-
Estrelinha	2°	08/06/2013	M	Jersey Holando	15/06/2013	22/06/2013	29/06/2013	Incompleto	positivo	não	116 dias
Asa branca	2°	06/07/2013	F	Girolando	13/07/2013	20/07/2013	27/07/2013	não vacinada	positivo	não	88 dias
Pitissa jersey	3°	18/07/2013	F	Jersey Holando	25/07/2013	01/08/2013	08/08/2013	completo	negativo	não	-
Manhosa branco	6°	21/07/2013	M	Girolando	28/07/2013	04/08/2013	11/08/2013	completo	negativo	não	-
Cartucha	6°	21/07/2013	M	Nelore/Gir	28/07/2013	04/08/2013	11/08/2013	não vacinada	negativo	não	-

Datas negritadas correspondem às datas da coleta em que as amostras fecais resultaram positivas para RV na EGPA

\* informações sobre a idade do animal no ato da coleta da amostra que resultou positiva para RV na EGPA ou resultado da genotipagem do RV, quando for o caso.



Identificação bezerro(a) (nome da mãe)	PARTO FÊMEA	Data de nascimento bezerro(a)	Sexo	Raça	Coleta 7° dia	Coleta 14° dia	Coleta 21° dia	Protocolo da Primovacinação	Resultado EGPA	Morte do animal	Outros*
Gauchinha	4°	08/08/2013	F	Jersey Holando	15/08/2013	22/08/2013	29/08/2013	Incompleto	positivo	não	56 dias
Sem terra	1°	08/08/2013	M	Girolando	15/08/2013	22/08/2013	29/08/2013	não vacinada	negativo	não	-
Marelinha jersey	1°	15/08/2013	M	Jersey Holando	22/08/2013	29/08/2013	05/09/2013	completo	positivo	não	49 dias
Polaca	2°	15/08/2013	F	Holandês	22/08/2013	29/08/2013	05/09/2013	Incompleto	negativo	não	-
Rainha	6°	16/08/2013	F	Girolando	23/08/2013	30/08/2013	06/09/2013	não vacinada	negativo	não	-
Brasinha (malhada)	6°	17/08/2013	F	Girolando	24/08/2013	31/08/2013	07/09/2013	completo	positivo	não	47 dias
Brasinha (vermelha)	6°	17/08/2013	F	Girolando	24/08/2013	31/08/2013	07/09/2013	completo	negativo	não	-
Cocada Bianco	2°	17/08/2013	F	Girolando	24/08/2013	31/08/2013	07/09/2013	Incompleto	negativo	não	-
Barquinha F	2°	24/08/2013	F	Girolando	31/08/2013	07/09/2013	14/09/2013	completo	negativo	não	-
Pombinha F	3°	31/08/2013	M	Girolando	07/09/2013	14/09/2013	21/09/2013	completo	negativo	não	-
Pintadinha	5°	07/09/2013	M	Girolando	14/09/2013	21/09/2013	28/09/2013	completo	negativo	não	-
Andurinha F	2°	08/09/2013	F	Girolando	15/09/2013	22/09/2013	29/09/2013	completo	negativo	não	-
Rebeca F	2°	09/09/2013	F	Girolando	16/09/2013	23/09/2013	30/09/2013	completo	negativo	sim	-
Roxinha	2°	10/09/2013	F	Girolando	17/09/2013	24/09/2013	01/10/2013	completo	negativo	não	-
Borracha	1°	12/09/2013	M	Holandês	19/09/2013	26/09/2013	<b>03/10/2013</b>	não vacinada	positivo	não	G6P[5]
Chifrinha Bianco	2°	16/09/2013	M	Girolando	23/09/2013	<b>30/09/2013</b>	07/10/2013	Incompleto	positivo	sim	-
Cabrita F	5°	19/09/2013	M	Jersey Holando	26/09/2013	<b>03/10/2013</b>	10/10/2013	não vacinada	positivo	não	G6P[5]
Neguinha Bianco	2°	19/09/2013	M	Jersey Holando	26/09/2013	03/10/2013	10/10/2013	completo	negativo	não	-
Blz	4°	22/09/2013	M	Jersey	29/09/2013	06/10/2013	13/10/2013	completo	negativo	não	-
Pintasilva	4°	25/09/2013	M	Girolando	<b>02/10/2013</b>	09/10/2013	16/10/2013	completo	positivo	sim	-
Coração	1°	04/10/2013	F	Girolando	<b>11/10/2013</b>	sem coleta	sem coleta	não vacinada	positivo	sim	-
Pipoca Bianco	2°	09/10/2013	M	Girolando	<b>16/10/2013</b>	23/10/2013	30/10/2013	completo	positivo	não	-
Jamanta	5°	13/10/2013	F	Girolando	20/10/2013	27/10/2013	03/11/2013	completo	negativo	não	-

Datas negritadas correspondem às datas da coleta em que as amostras fecais resultaram positivas para RV na EGPA

\* informações sobre a idade do animal no ato da coleta da amostra que resultou positiva para RV na EGPA ou resultado da genotipagem do RV, quando for o caso.

Identificação bezerro(a) (nome da mãe)	PARTO FÊMEA	Data de nascimento bezerro(a)	Sexo	Raça	Coleta 7º dia	Coleta 14º dia	Coleta 21º dia	Protocolo da Primovacinação	Resultado EGPA	Morte do animal	Outros*
Boneca	10°	20/10/2013	F	Girolando	27/10/2013	03/11/2013	10/11/2013	Incompleto	negativo	não	-
Sofia Bianco	3°	30/10/2013	F	Girolando	06/11/2013	13/11/2013	20/11/2013	completo	negativo	não	-
Bacana F	2°	02/11/2013	F	Girolando	09/11/2013	16/11/2013	23/11/2013	completo	negativo	não	-
Gir	6°	25/11/2013	F	Girolando	02/12/2013	09/12/2013	16/12/2013	completo	negativo	não	-
Morena tonin	10°	28/11/2013	M	Girolando	<b>05/12/2013</b>	12/12/2013	19/12/2013	não vacinada	positivo	não	-
Bordada	2°	05/12/2013	F	Girolando	12/12/2013	19/12/2013	26/12/2013	não vacinada	negativo	não	-
Lambreta	2°	07/12/2013	F	Girolando	14/12/2013	21/12/2013	28/12/2013	completo	negativo	não	-
Chita	6°	23/12/2013	F	Girolando	<b>30/12/2013</b>	06/01/2014	13/01/2014	completo	positivo	não	-
Araça-pijuíta	1°	25/12/2013	M	Girolando	01/01/2014	<b>08/01/2014</b>	15/01/2014	completo	positivo	não	-
Tobogam F	7°	27/12/2013	F	Girolando	03/01/2014	10/01/2014	17/01/2014	completo	negativo	não	-
Turuna	3°	10/01/2014	F	Girolando	17/01/2014	24/01/2014	<b>31/01/2014</b>	completo	positivo	não	-
Figueira	4°	11/01/2014	M	Girolando	18/01/2014	<b>25/01/2014</b>	01/02/2014	completo	positivo	não	-
Maiada Bianco	3°	12/01/2014	M	Girolando	<b>19/01/2014</b>	26/01/2014	02/02/2014	Incompleto	positivo	não	-
Careta	5°	17/01/2014	F	Girolando	<b>24/01/2014</b>	31/01/2014	07/02/2014	completo	positivo	não	-
Negona chifruda	10°	19/01/2014	M	Girolando	<b>26/01/2014</b>	02/02/2014	09/02/2014	completo	positivo	não	-
Chifrinha J	4°	20/01/2014	F	Jersey Holando	27/01/2014	<b>03/02/2014</b>	10/02/2014	completo	positivo	não	-
Juaninha	2°	28/01/2014	M	Jersey Holando	04/02/2014	<b>11/02/2014</b>	18/02/2014	completo	positivo	não	-
Baixinha	1°	28/01/2014	M	Jersey Holando	04/02/2014	11/02/2014	18/02/2014	completo	negativo	sim	-
Baguncinha	4°	11/02/2014	M	Jersey Holando	18/02/2014	25/02/2014	04/03/2014	completo	negativo	não	-
Jersinha	2°	18/02/2014	F	Jersey Holando	25/02/2014	04/03/2014	11/03/2014	completo	negativo	não	-

Datas negritadas correspondem às datas da coleta em que as amostras fecais resultaram positivas para RV na EGPA

\* informações sobre a idade do animal no ato da coleta da amostra que resultou positiva para RV na EGPA ou resultado da genotipagem do RV, quando for o caso.

## APÊNDICE C: Soluções e Tampões

---

- **Hidratação da sílica**
  - 60 g de sílica
  - Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
  - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
  - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
  - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
  - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
  - Desprezar 440 mL do sobrenadante
  - Adicionar 600  $\mu$ L de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
  - Aliquotar e autoclavar
  
- **Solução L6**
  - 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
  - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
  - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
  - 2,6 g de Triton x 100
  
- **Solução L2**
  - 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
  - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
  
- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)**
  - 0,2 mL de azul de bromofenol 1%
  - 6,0 mL de SDS 10%
  - 1 mL de 2-mercaptoetanol
  - 2,5 mL de TRIS-HCl 0,5 M
  
- **Tampão de corrida para EGPA**
  - 30 g de TRIS (0,24 M)
  - 14,4 g de ácido aminoacético (glicina) ( $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ) (0,19 M)
  - Água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Tampão estabilizador de rotavírus (TRIS/Ca<sup>++</sup> 10 x)**
  - 12,12 g TRIS (10 mM)
  - 2,2 g cloreto de cálcio (1,5 mM)
  - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 L
  - pH = 7,4
- **SDS 10%**
  - 5 g dodecilsulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S)
  - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 mL
- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
  - 24 mL fenol saturado
  - 24 mL clorofórmio
  - 1 mL álcool isoamílico
- **Lower TRIS pH 8,8 para confecção do gel inferior da EGPA**
  - 36,34 g de TRIS (1,5 M)
  - Água bidestilada q.s.p. 200 mL
- **Upper TRIS pH 6,8 para confecção do gel superior da PAGE**
  - 12,12 g de TRIS (0,5 M)
  - Água bidestilada q.s.p. 200 mL
- **Solução Acrilamida / Bisacrilamida**
  - 1,3 g de bisacrilamida
  - 50 g de acrilamida
  - Água bidestilada q.s.p. 100 mL
- **Solução fixadora para EGPA**
  - 30 mL de álcool etílico absoluto
  - 1,5 mL de ácido acético
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução de nitrato de prata para EGPA**
  - 0,55 g de nitrato de prata
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução reveladora para EGPA**
  - 9 g de hidróxido de sódio
  - 2,5 mL de formaldeído
  - 0,06 g de borohidreto de sódio
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução *stop* da coloração para EGPA**
  - 15 mL de ácido acético P.A.
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução conservadora para EGPA**
  - 15 mL de álcool etílico P.A.
  - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Gel inferior (7,5%) ou gel de resolução da EGPA**
  - 5 mL de Lower TRIS
  - 3 mL de acrilamida/bisacrilamida
  - 50 µL de TEMED
  - 0,56 mL de persulfato de amônio 2%
  - 11,44 mL de água bidestilada
- **Gel superior (3,5%) ou gel de empilhamento da EGPA**
  - 2,5 mL de Upper TRIS
  - 1 mL de acrilamida/bisacrilamida
  - 100 µL de TEMED
  - 0,60 mL de persulfato de amônio 2%
  - 6,20 mL de água bidestilada

## APÊNDICE D: Protocolo de Técnicas

---

- **Suspensão fecal – Extração bruta**
  - 1g do extrato fecal
  - 9 ml de tampão TRIS/Ca<sup>++</sup> 1x  
(Para amostras muito líquidas estabelecer a proporção 1:2)
  - Homogeneizar
  - Centrifugar 10 min a 10.000 x g
  - Recolher sobrenadante
  - Identificar e estocar em frascos a 4º C
  
- **Extração do RNA: associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/ isotiocianato de guanidina**
  - 400 µL da suspensão fecal
  - 400 µL de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico
  - Homogeneizar em vórtex
  - Banho-maria a 56º C durante 15 min.
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 10 min.
  - Recolher sobrenadante em outro tubo
  - 30 µL de sílica hidratada
  - 900 µL de solução L6
  - Homogeneizar em vórtex
  - Agitar durante 30 min. à temperatura ambiente
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
  - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
  - Adicionar 500 µL de solução L2
  - Homogeneizar em vórtex
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
  - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
  - Adicionar 500 µL de solução L2
  - Homogeneizar em vórtex
  - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.

- Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
- Adicionar 1 mL de etanol a 70%
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
- Desprezar sobrenadante
- Adicionar 1 mL de etanol a 70%
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
- Desprezar sobrenadante
- Adicionar 1 mL de acetona PA
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 g durante 1 min.
- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em banho-maria à 56° C durante 15 min. (tubo aberto)
- Adicionar 50 µL de água MilliQ autoclavada
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria à 56° C durante 15 min. (tubo fechado)
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 2 min.
- Recolher sobrenadante em eppendorf de 500 µL
- Estocar a -20°C

- **Montagem das placas de eletroforese e aplicação das amostras:**

- Placas de vidro, espaçadores e pente: lavar com água e sabão, secar e limpar com álcool.
- Montar as duas placas de vidro separadas pelos espaçadores inferiores e laterais.
- Fixar as placas com grampos
- Selar as extremidades com ágar 2%.
- Adicionar gel inferior (gel de resolução) e aguardar a polimerização
- Adicionar o gel superior (gel de empilhamento)
- Introduzir o pente para formação das canaletas
- Aguardar polimerização

- Após completa polimerização do gel, fixar cuidadosamente as placas à cuba de eletroforese.
  - Adicionar tampão de corrida nos reservatórios superior e inferior da cuba.
  - Retirar espaçador inferior e o pente
  - Adicionar amostras nas canaletas – amostras: alíquotar 15 µL de amostra de RNA + 3µL de tampão de amostra - em tubo tipo ependorff novo - banho-maria 56°C por 10 a 15 minutos.
  - Após adição de todas as amostras, ligar a fonte da eletroforese e ajustar a corrente (inicialmente manter em 60V a 20mA; aumentar a corrente para 100V após a migração das amostras para o gel inferior).
  - Aguardar a corrida eletroforética mediante visualização da migração do corante azul de bromofenol próximo ao limite inferior do gel de poliacrilamida
- **Coloração do gel de poliacrilamida**
    - Após a eletroforese, transferir o gel em um recipiente e submergir em solução fixadora por 30 minutos (o gel pode permanecer por mais tempo nesta solução)
    - Desprezar solução fixadora
    - Adicionar a solução contendo o corante nitrato de prata. Deixar o gel por 30 minutos nesta solução, sob agitações periódicas
    - Desprezar a solução corante; lavar o gel 2 vezes com água destilada
    - Adicionar a solução reveladora
    - Manter o gel na solução reveladora até visualização das bandas
    - Após visualização das bandas, interromper a revelação pela adição da solução STOP por 15 minutos, no mínimo
    - Manter o gel em solução conservadora até a secagem e/ou fotodocumentação





