



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

RITA DE CÁSSIA LINARES

**FREQÜÊNCIA DE DIAGNÓSTICO DO ROTAVÍRUS GRUPO
A EM LEITÕES LACTENTES DE REBANHOS SUINÍCOLAS
NÃO-VACINADOS**

Londrina/PR
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA ANIMAL**

RITA DE CÁSSIA LINARES

**FREQÜÊNCIA DE DIAGNÓSTICO DO ROTAVÍRUS GRUPO
A EM LEITÕES LACTENTES DE REBANHOS SUINÍCOLAS
NÃO-VACINADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri

Co-orientator: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina/PR

2007

RITA DE CÁSSIA LINARES

**FREQÜÊNCIA DE DIAGNÓSTICO DO ROTAVÍRUS GRUPO A EM LEITÕES
LACTENTES DE REBANHOS SUÍNÍCOLAS NÃO-VACINADOS**

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Marco Antônio Bacellar Barreiros
Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI/SC)

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
Universidade Estadual de Londrina (DMVP/CCA)

Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina (DMVP/CCA)

Londrina, 25 de setembro de 2007.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal, sob orientação da Prof^a Dr^a Alice Fernandes Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

“ Você fará tolices, mas faça-as com entusiasmo! “

COLETTE

*Ao meu mais puro e verdadeiro amor; João Gabriel,
Meus pais, irmão, a Deus.*

AGRADECIMENTOS

Ao João Gabriel, minha inesgotável fonte de razão, força, garra, persistência, obrigada por todo o amor, carinho e compreensão, pela paciência nas muitas horas de ausência e por tudo o que representa em mim;

Agradeço aos meus familiares, meus pais, pelo apoio, suporte e carinho recebidos nos bons e difíceis momentos desse percurso; ao meu irmão Sérgio, minha cunhada Ivanilda e ao novo membro da família que está por vir, obrigada pelo constante incentivo, preocupação e infinito amor;

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

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

A Kerlei Cristina Médici pela incessante ajuda, pelo apoio nas horas de extrema dificuldade, pela fonte inesgotável de amizade desde os primórdios deste empreendimento, muito obrigada sempre por todas as etapas deste trabalho tão árduo;

A Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri, pela orientação e constante apoio;

Ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri, pela co-orientação e confiança, incentivo e suporte no decorrer da pesquisa;

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Dra. Elisabete Takiuchi, Prof. Dr. João Luis Garcia, Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri, pelas

valiosas contribuições e ao Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri por seu grande esforço nas correções finais;

Aos colegas do Programa de Mestrado em Ciência Animal, em especial a Julian Borosky e Danilo Stipp, por sua presença sempre auxiliadora em todos os momentos;

A Dalíria do Prado e Maria Yoshikawa, técnicas do Laboratório de Virologia Animal da UEL, que sempre estiveram presentes, auxiliando em todas as etapas do desenvolvimento do trabalho, além de todo o carinho, atenção, palavras de incentivo e amizade durante todo o processo, e que certamente foram fundamentais para a conclusão da pesquisa;

Aos demais colegas do Laboratório de Virologia Animal da UEL, entre eles, Elisabete Takiuchi, Juliana Dias, Kledir Sporr, Danilo de Cuffa;

A Helenice Kieski pela sempre pronta ajuda, pelo seu enorme coração meu muito obrigada;

A equipe técnica de Médicos Veterinários do Depto. de Suinocultura da Intervet do Brasil Veterinária Ltda, em especial aos Drs. César Feronato e Wladimir Grieder, pela colheita das amostras fecais analisadas neste trabalho;

Por fim agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

LINARES, R.C. **Frequência de diagnóstico do rotavírus grupo A em leitões lactentes de rebanhos suínos não-vacinados.** [Diagnosis frequency of group A rotavirus in suckling piglets from unvaccinated pig herds]. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

A diarreia neonatal é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em leitões, ocasionando consideráveis prejuízos econômicos à suinocultura em todo o mundo. A etiologia da diarreia neonatal é complexa e multifatorial e o rotavírus grupo A é considerado a principal etiologia viral de diarreia em leitões lactentes. O objetivo desse estudo foi determinar a frequência de diagnóstico, distribuição etária e a associação com diarreia da infecção por rotavírus grupo A em leitões lactentes de granjas de duas regiões geográficas brasileiras que são responsáveis por 81% da produção nacional de carne suína. A frequência de diagnóstico do rotavírus suíno grupo A foi avaliada no período de 2004 a 2007, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, em 681 amostras fecais de leitões lactentes, sendo 428 diarreicas e 253 com consistência normal (grupo controle). Os animais eram provenientes de 130 granjas, localizadas em 80 municípios dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Rotavírus suíno com perfil eletroforético característico do grupo A foi detectado em 193 (28,3%) amostras, das quais 157 (36,7%; $p=0,001$) eram amostras diarreicas e 36 (14,2%) amostras fecais com consistência normal. A infecção foi identificada em animais de todas as faixas etárias avaliadas e a maior frequência 54,7%; ($p=0,001$) de diagnóstico ocorreu em leitões diarreicos com 21 a 25 dias de idade. A alta taxa (32,3%) de diagnóstico do rotavírus em fezes diarreicas de leitões com 1 a 7 dias de vida sugere a necessidade da adoção de condutas que objetivem o incremento da imunidade passiva. A frequência de diagnóstico e a ampla distribuição das infecções pelo rotavírus grupo A, nos rebanhos das regiões geográficas avaliadas nesse estudo, ratificam a importância da rotavirose na etiologia dos episódios de diarreia de leitões lactentes no Brasil.

Palavras-chave: Suínos; diarreia neonatal; rotavírus grupo A; EGPA/PAGE.

ABSTRACT

LINARES, R.C. Diagnosis frequency of group A rotavirus in suckling piglets from unvaccinated pig herds. [Frequência de diagnóstico do rotavírus grupo A em leitões lactentes de rebanhos suínos não-vacinados]. 2007. 80p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

The neonatal diarrhea is one of the main causes of morbidity and mortality in pigs and cause great economical losses in pig herds worldwide. The etiology of neonatal porcine diarrhea is complex and multifactorial. The group A rotavirus is an important etiological agent of viral diarrhea in suckling piglets. Reports of rotavirus prevalence in porcine feces are lacking in Brazilian pig herds. The objective of this work was to determine the frequency, age distribution, and association with diarrhea of group A rotavirus infections in suckling piglets of farms located in a geographical region that produce 81% of the Brazilian pork meat. The group A rotavirus frequency was evaluated from 2004 to 2007 by polyacrylamide gel electrophoresis technique in 681 stool samples collected from 428 diarrheic and 253 asymptomatic (control-group) suckling piglets. The sampling was from 130 pig herds, located in 80 counties from Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul, and Mato Grosso States. Positive results with group A rotavirus electropherotype were detected in 193 (28,3%) samples of the wich 157 (36.7%; $p=0.001$) were diarrheic stool samples and 36 (14.2%) samples with normal consistency. The infection was detected in all age groups evaluated with higher diagnosis frequency (54.7%; $p=0.001$) in diarrheic piglets with 21 to 25-days-old. The rate (32.3%) of rotavirus diagnosis in diarrheic fecal samples from 1 to 7-days-old piglets suggest that profilatic measures should be adopted to increase the passive immunity. The diagnosis frequency and the wide distribution of the group A rotavirus infections in porcine herds from all geographical regions evaluated in this study ratifies the importance of the rotaviruses in the suckling piglets diarrhea in Brazilian pig herds.

Key Words: Swine; neonatal diarrhea; group A rotavirus; PAGE.

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA

Introdução	16
Rotavírus	18
Rotavirose	28
Epidemiologia da rotavirose Suína.....	28
Transmissão e patogenia	34
Diagnóstico	35
Profilaxia	39
Referência	41

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral	52
2.2. Objetivos Específicos	52

3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3.1 Frequência de diagnóstico do rotavírus grupo A em leitões lactentes de rebanhos suínos não-vacinados.

Introdução	54
Material e Métodos	57
<i>Amostras de fezes</i>	57
<i>Vírus e células</i>	57
<i>Extração do RNA</i>	58
<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida - EGPA</i>	58
<i>Análise estatística</i>	58
Resultados e Discussão.....	59
Referências.....	67

4. CONCLUSÕES

	72
--	----

ANEXOS

1. Lista de reagentes	74
2. Soluções e tampões	75
3. Protocolo de técnicas	79

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

- Fig.1.** Eletroforese em gel de poliacrilamida do genoma RNA fita dupla segmentado (esquerda) e as proteínas codificadas por cada segmento genômico dos rotavírus (centro). Partícula de rotavírus representada esquematicamente (direita acima) e partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia, associada ao processamento de imagem por computador (direita abaixo). 19
- Fig.2.** Perfis eletroforéticos do genoma viral (dsRNA) dos rotavírus..... 20
- Fig.3.** Evolução da produção da carne suína no Brasil no período de 2004 a 2007 (ABIPÉCS).....28

LISTA DE TABELAS

Frequência de diagnóstico do rotavírus grupo A em leitões lactentes de rebanhos suínos não-vacinados

- Tabela 1.** Distribuição do resultado da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para a detecção do rotavírus suíno grupo A, de acordo com as características das fezes de leitões lactentes avaliados, Brasil:2004-2007..... 65
- Tabela 2.** Distribuição das amostras de fezes diarréicas de leitões lactentes positivas e negativas para o rotavírus suíno grupo A pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), de acordo a faixa etária dos animais, Brasil:2004-2007..... 66
- Tabela 3.** Distribuição das amostras de fezes com características normais, (controle) de leitões lactentes positivas e negativas para o rotavírus suíno grupo A pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo a faixa etária dos animais, Brasil:2004-2007.....66

LISTA DE QUADROS

Revisão de literatura

- Quadro 1.** Freqüência de diagnóstico etiológico do rotavírus grupo A em fezes de leitões nos continentes Africano, Asiático e na Oceania.....30
- Quadro 2.** Freqüência de diagnóstico etiológico do rotavírus grupo A em fezes de leitões na Europa.....31
- Quadro 3.** Freqüência de diagnóstico etiológico do rotavírus grupo A em fezes de leitões nas Américas.....32
- Quadro 4.** Freqüência de diagnóstico etiológico do rotavírus grupo A em fezes de leitões no Brasil.....33

Freqüência de diagnóstico do rotavírus grupo A em leitões lactentes de rebanhos suínos não-vacinados

- Quadro 1.** Distribuição das amostras de fezes de leitões lactentes colhidas para o diagnóstico do rotavírus suíno grupo A por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com as características das fezes e o local de colheita, Brasil, 2004-2007.....65

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

aa – aminoácido

ABIPECS - Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportação/ Carne Suína

bd – bidestilada

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

EGPA – Eletroforese em gel de poliacrilamida

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

HT 29 - células de tumor retal humano

IF - Imunofluorescência

LA – Látex-aglutinação

MA-104 - células renais de macaco *Rhesus*

ME - Microscopia eletrônica

mM – milimolar (10^{-3} molar)

NSP - proteína não-estrutural (*non-structural protein*)

PBS - tampão salina-fosfato

PCR - Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

pH - potencial hidrogeniônico

q.s.p. – quantidade suficiente para

RNA - ácido ribonucleico

RNAfd - ácido ribonucleico fita dupla

RT – Transcrição-reversa (*reverse-transcription*)

RV - rotavírus

VP - proteína viral (*viral protein*)

SDS - dodecil sulfato de sódio

TBE - tampão Tris-borato-EDTA

TRIS - hidroximetil aminometano

μL - Microlitro (10^{-6} litro)

μM - Micromolar (10^{-6} Molar)

μg – Micrograma (10^{-6} grama)

1. REVISÃO DE LITERATURA

Introdução

A suinocultura representa um importante segmento do agronegócio brasileiro. A produção de carne suína no Brasil é uma atividade pecuária altamente tecnificada. Além da produção de proteína animal para o consumo humano, tanto para o mercado interno quanto o externo, a suinocultura nacional contribui com a geração de divisas e impostos para o país e milhares de empregos nas zonas rurais e urbanas (HENKE, 2000).

O modelo atual da produção de suínos no Brasil é regido por parâmetros de produção que, para o sucesso da atividade, devem ser rigorosamente monitorados e alcançados a cada ciclo de produção. Dentre os vários parâmetros zootécnicos de produção, o número de leitões desmamados/porca/ano é um importante indicador do desempenho da atividade. Esse parâmetro pode ser influenciado negativamente por vários fatores relacionados ao manejo, nutrição e sanidade do rebanho (ALFIERI et al., 1994; DEWEY et al., 1995).

Com relação ao fator sanitário, os episódios de diarreias neonatais, na dependência da frequência e da intensidade, podem contribuir consideravelmente com a redução do número de leitões desmamados/porca/ano em decorrência das taxas de letalidade observadas em rebanhos onde esse distúrbio entérico constitui um grave problema sanitário. Outro aspecto, de importância nas diarreias neonatais, é o aumento do custo de produção, que inclui mão de obra e medicamentos, para o tratamento dos animais doentes. Alterações nas taxas de ganho de peso e conversão alimentar na maternidade, originadas pelas infecções entéricas, ocasiona desuniformidade dos lotes à desmama e compreende outro

aspecto negativo das diarreias em leitões lactentes (SVENSMARK et al., 1989; SILVA et al., 1999).

As infecções entéricas em leitões lactentes são multifatoriais e multietiológicas. Fatores nutricionais, de manejo e imunológicos atuam em sinergismo com os microrganismos presentes no meio ambiente que, na dependência da virulência e da dose infectante, podem ser responsáveis por graves episódios de diarreias neonatais (DRIESEN et al., 1993; WIELER et al., 2001).

Dentre os agentes infecciosos, microrganismos de várias classes atuando em infecções isoladas ou, mais freqüentemente em associação, são os principais determinantes de infecções entéricas em leitões lactentes. Devido à freqüência na ocorrência em fezes diarreicas destacam-se: *Escherichia coli*, *Clostridium perfringes* tipo C, *Isospora suis*, *Cryptosporidium parvum* e rotavírus (DRIESEN et al., 1993; ALFIERI et al., 1994; CALDERARO et al., 2001; WIELER et al., 2001).

Com relação à etiologia viral de infecções entéricas, os rotavírus (RV) destacam-se em todo o mundo como um dos principais vírus causadores de diarreia tanto em leitões lactentes quanto em recém-desmamados (SVENSMARK, 1983; LIPRANDI et al., 1987; FITZGERALD et al., 1988; JOHNSON et al., 1990; GREGORI et al., 2000). O controle e a profilaxia das rotaviroses constituem-se em medidas sanitárias fundamentais para o bom desempenho dos leitões no modelo atual de produção que prevalece na suinocultura nacional.

Rotavírus

Os RV são partículas não-envelopadas com aproximadamente 70-90 nm de diâmetro e simetria icosaédrica que pertencem à família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus* (ESTES, 1996). O capsídeo viral é constituído por três camadas concêntricas de proteínas que formam o capsídeo externo, intermediário e interno (*core*) onde estão contidos o genoma e a transcriptase viral (PRASAD e CHIU, 1994). O genoma dos RV é constituído de RNA fita dupla (RNAfd) com 11 segmentos, que codificam seis polipeptídeos não-estruturais denominados NSP (*Non-Structural Protein*) e seis estruturais denominados VP (*Viral Protein*) (MATTHEWS, 1979; DESSELBERGER, 1989).

Os 11 segmentos genômicos dos RV são numerados de acordo com a ordem de migração de cada um em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). O primeiro segmento, com maior massa molecular, e o décimo-primeiro, de menor massa, correspondem aos segmentos de menor e de maior migração na EGPA, respectivamente, (PEDLEY et al., 1986). Cada segmento de dsRNA codifica uma proteína, com exceção do segmento genômico 11 que codifica duas NSP (MATTION et al., 1991).

As proteínas VP1, VP2, VP3 formam o *core*; a proteína VP6 o capsídeo intermediário e as proteínas VP4 e VP7, o capsídeo externo dos RV (MIDTHUN e KAPIKIAN, 1996). A figura 1 representa, esquematicamente, os segmentos genômicos dos RV e as proteínas codificadas por cada segmento, bem como a sua localização na partícula viral.

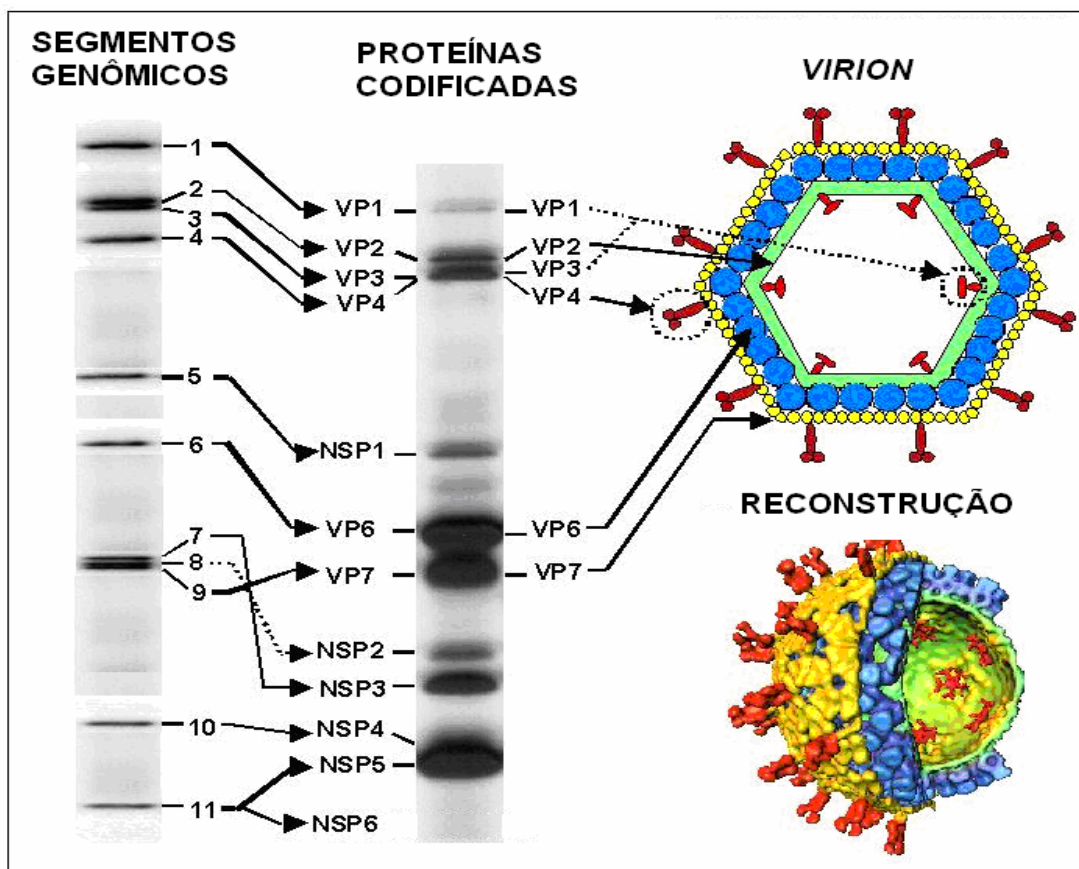


FIGURA 1. Eletroforese em gel de poliácridamida do genoma de rotavírus, RNA fita dupla, segmentado (esquerda) e as proteínas codificadas por cada segmento genômico (centro). Partícula de rotavírus representada esquematicamente (direita acima); partícula de rotavírus e sua estrutura determinada por eletromicroscopia 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*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott & Wilkins, 2001 (adaptado).
 NOTA: Segmentos numerados com base na migração do genoma da estirpe SA11 do rotavírus grupo A.

O padrão genômico básico para os RV do grupo A consiste de classes, ou regiões de diferentes massas moleculares, contendo os segmentos de dsRNA de 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 freqüentemente representada como 4-2-3-2,

indicando o número de segmentos genômicos encontrados em cada classe do grupo A dos RV (PEDLEY et al., 1983).

Uma importante característica dos RV pertencentes ao grupo A é a migração dos segmentos 7, 8 e 9 em forma de *triplet* ou trinca. Essa característica deve-se à semelhança de suas respectivas massas moleculares. Por outro lado, RV atípicos (grupos B-G) não apresentam este *triplet*. Entre os RV atípicos encontrados em mamíferos, os eletroferogrupos mais importantes constituem o grupo B, com disposição 4-2-2-3, e o grupo C que apresenta uma distribuição genômica identificada como 4-3-2-2. Os eletroferogrupos D, F e G são característicos de espécies aviárias e o grupo E de suínos como podemos visualizar na figura 2 (McNULTY et al., 1984; CHASEY et al., 1986; PEDLEY et al., 1986; TODD e McNULTY, 1986).

Rotavírus grupo A										Outros grupos			
Típicos										Atípicos			
Humanos	Humanos	Bovinos	Suínos	Coelhos						B	C	D	E
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
longo curto		a	b	c	d	d	e	e	f	f			

Figura 2. Representação esquemática do padrão de migração, em Eletroforese em Gel de Poliacrilamida, do RNAfd relativo aos eletroferogrupos A, B, C, D e E de *Rotavirus*.

FONTE: ALFIERI, A.A. *Padronização de Métodos para caracterização genotípica de Rotavírus grupos A e C de origem humana e animal*. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 1996, 352p. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Contudo, o perfil genômico obtido por meio da EGPA não deve ser utilizado como único critério de classificação dos RV pois, alterações no genoma viral, como rearranjo, podem levar a mudanças no padrão de migração dos segmentos (SAIF e JIANG, 1994). Uma desvantagem da análise eletroforética é que este procedimento não permite a genotipagem dos RV, pois diferentes sorotipos podem apresentar perfis eletroforéticos similares (MARKOWSKA et al., 1996).certo

A diversidade genômica dos RV é atribuída às alterações no genoma decorrentes de: i) mutação pontual; ii) *reassortments* ; ou iii) rearranjo.

A mutação pontual consiste em alterações na seqüência de nucleotídeos que ocorrem durante a replicação do genoma. O acúmulo de mutações pontuais tem sido observado em isolados de RV obtidos durante uma única epidemia (PALOMBO et al., 1993). Estas alterações podem originar substituições nos aminoácido, podendo alterar o sítio antigênico, resultando em estirpes resistentes aos anticorpos neutralizantes produzidos contra as estirpes parentais (TANIGUCHI et al., 1985).

Reassortments consistem em mudanças no genoma que ocorrem devido a trocas de segmentos de dsRNA entre diferentes estirpes virais (ESTES e COHEN,

1989). Este fenômeno, que ocorre somente em vírus com genoma segmentado, é denominado pseudo-recombinação em outros vírus. Por meio desse mecanismo, novas estirpes virais podem surgir rapidamente e co-infecção com estirpes geneticamente próximas promove o mesmo mecanismo de forma mais eficiente. As estirpes originadas por este processo são chamadas de *reassortants* (TANIGUCHI et al., 1985).

Alterações em porções significativas da seqüência em um mesmo segmento genômico, muitas vezes na forma de deleções ou duplicações, são denominadas de rearranjo. Estas alterações ocasionam modificações na massa molecular dos segmentos de dsRNA, resultando em um perfil eletroforético distinto daquele original (GONZALES et al., 1989).

Estes três mecanismos parecem ser responsáveis pela grande variabilidade e complexidade dos RV. Kang et al. (2005) em um estudo epidemiológico das infecções por RV na Índia, concluíram que transmissões zoonóticas e *reassortments* entre estirpes de RV provenientes de seres humanos e de animais contribuem com a diversidade de estirpes virais que infectam humanos. Infecções heterólogas, entre os modelos humano e animal, contribuem para uma potencial difusão interespecies dos RV .

A classificação antigênica dos RV é realizada com base nas propriedades das proteínas VP6, VP4 e VP7 (HOSHINO e KAPIKIAN, 1994).

A proteína VP6 apresenta arranjo em 260 unidades morfológicas, T=13, que apresentam estrutura trimérica. São encontradas 780 moléculas de VP6 por vírion que, por ser a proteína mais abundante na partícula viral é utilizada como o

principal antígeno na detecção dos RV (GORZIGLIA et al., 1985; KAPIKIAN e CHANOCK, 1990).

A VP6 é codificada pelo sexto segmento genômico e é responsável pela especificidade sorológica dos RV em sete grupos (A-G) e quatro subgrupos (KAPIKIAN e CHANOK, 1990). Gorziglia et al. (1988) demonstraram que anticorpos monoclonais produzidos contra os epítomos de VP6 relacionados com a especificidade de subgrupo, reagem tanto com a forma monomérica quanto com a trimérica de VP6. Entretanto, anticorpos monoclonais produzidos especificamente contra os subgrupos I ou II, reagiram somente com a forma trimérica. Este fato sugere que esta especificidade é determinada pelo arranjo estrutural da molécula de VP6.

A proteína VP4 está presente nas espículas dos RV (ANTHONY et al., 1991). São descritas 60 espículas de VP4 por partícula viral, que atravessam a camada de VP7 e interagem com a proteína VP6 (SHAW et al., 1993; PRASAD e CHIU, 1994).

Na presença de proteases a VP4 é clivada, originando duas outras proteínas, VP5 e VP8. Os epítomos responsáveis pela reatividade neutralizante cruzada estão localizados em VP5 e aqueles que apresentam especificidade sorotípica estão localizados na sub-unidade VP8 (MACKOW et al., 1988). Hardy et al. (1991) descreveram que uma maior variabilidade em VP8* e diferenças em aminoácidos nos sítios envolvidos na neutralização cruzada, devem ser responsáveis pela quebra na proteção homotípica entre duas estirpes de diferentes especificidades de VP4.

A VP4 apresenta diferentes funções como a atividade hemaglutinante; o aumento da infectividade após a clivagem proteolítica; a replicação *in vitro*; e a formação de *plaque* (KALIKA et al., 1983). A VP4 também é um antígeno indutor de anticorpos neutralizantes que apresenta variabilidade antigênica e desta forma, a caracterização dos RV em tipos, com base na especificidade de VP4, tornou-se necessária (HOSHINO et al., 1985).

De forma semelhante ao capsídeo intermediário (VP6), são encontradas 780 moléculas da proteína VP7 por partícula viral, arranjadas de forma trimérica (T=13). Esta proteína é glicosilada e constitui a base da camada do capsídeo externo (PRASAD e CHIU, 1994). A partir desta são projetadas as espículas de VP4.

A proteína VP7 é um dos principais antígenos presentes na partícula viral, capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes, considerados de importância na proteção da diarreia causada pelo RV (HOSHINO et al., 1985).

A VP6 também determina ainda a especificidade de subgrupo (SG) que permite a classificação antigênica dos RV do grupo A em SG I, SG II, SG I e II e SG não I não II (KANG et al., 2005; GHOSH et al., 2006).

Estes, (2001) conclui que a análise filogenética de partes da proteína VP6 tem resultado na classificação do RV grupo A humano em dois genogrupos. O genogrupo I que compreende os RV SG I-específicos e o genogrupo II que engloba as estirpes SG II, SG I e II e SG não-I não-II (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).

Os RV grupo A apresentam dupla especificidade para sorotipo, representada por VP4 e VP7 que são proteínas codificadas por diferentes

segmentos genômicos. Durante a replicação viral, os genes codificadores destes polipeptídeos segregam independentemente um do outro. Com isto, para a completa classificação sorológica dos RV grupo A, há necessidade da utilização de um duplo sistema de sorotipagem, também denominado sistema binário, que leve em consideração as características antigênicas tanto de VP4 quanto de VP7 (HOSHINO et al., 1985; OFFIT e BLAVAT, 1986; ESTES e COHEN, 1989).

Por questões de padronização de nomenclatura, os sorotipos VP4 são denominados sorotipos “**P**” (susceptíveis à **p**rotease), em razão de que a clivagem proteolítica desta proteína ativa a infectividade dos RV. Por ser uma glicoproteína, os sorotipos de RV grupo A relacionados ao polipeptídeo VP7 são denominados sorotipos “**G**” (ESTES e COHEN, 1989).

Com a técnica de neutralização e/ou análise seqüencial da proteína VP7 foi possível, até o momento, definir 15 sorotipos G (G1 – G15) em amostras de RV grupo A (GHOSH et al., 2006). Soros hiperimunes, mono e policlonais, utilizados para determinar a especificidade para os sorotipos G, freqüentemente, apresentam baixos títulos de anticorpos neutralizantes para a proteína VP4 e, com raras exceções, podem ser utilizados para determinação dos sorotipos P (MATSUDA et al., 1993).

Os sorotipos P foram inicialmente deduzidos por caracterização do gene VP4, por meio do sequenciamento de nucleotídeos (nt) e hibridação. Pelo menos 10 tipos de VP4 (P1 – P10) foram identificados com base nas diferenças de aminoácidos (aa) entre os tipos (ESTES e COHEN, 1989).

Gorziglia et al. (1990) definiram, por meio de testes de neutralização cruzada, o primeiro sorotipo P utilizando anti-soro para a proteína VP4 expressa

em baculovírus. A utilização desta metodologia possibilitou que vários outros sorotipos P fossem identificados (GENTSCH et al., 1996). Recentemente um duplo sistema de classificação para os sorotipos P têm sido aplicado, com o P genotipo (designado por P[]), determinado pela sequência do gene VP4, e o sorotipo P, pela neutralização da proteína VP4. Um total de 27 P genótipos e 15 P sorotipos foram identificados para os RV do grupo A (GHOSH et al., 2006; KHAMRIN et al., 2007).

Estudos moleculares indicaram a genotipagem como a forma mais fácil e eficaz para a definição dos sorotipos/genótipos dos RV grupo A, particularmente devido: i) a boa correlação com a especificidade antigênica; ii) uso de reagentes sintéticos universais; iii) possibilidade de análise de maior número de amostras e iv) sensibilidade e especificidade (GOUVÊA et al., 1990; PARWANI et al., 1993; GENTSCH et al., 1996).

Entre as possíveis combinações dos diferentes genótipos P (27) e G (15), algumas são mais freqüentes, inclusive apresentando diferenças entre genótipos mais comuns de acordo com a espécie hospedeira. Desta forma, estudos sobre a distribuição destes genótipos em infecções humanas e animal, têm demonstrado o predomínio na freqüência de algumas associações entre os genótipos P e G (NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1991; GENTSCH et al., 1992; GHOSH et al., 2006; KHAMRIN et al., 2007).

Em suínos já foram identificadas estirpes de RV grupo A correspondentes aos genótipos G1, G3, G4, G5, G6, G9, G10, G11, G12 e P[5], P[6], P[7], P[14], P[19] (BOHL et al., 1984; NAGESHA e HOLMES, 1988; RUIZ et al., 1988; ZABEREZHNY et al., 1994; MARTELLA et al., 2001; GHOSH et al., 2006).

Os primeiros estudos com relação à especificidade dos hospedeiros dos diferentes genótipos indicavam que a transmissão interespecies de RV, provavelmente, fosse um evento raro (SCHROEDER et al., 1982; FLORES et al., 1986). A utilização de metodologias moleculares, identificou estirpes de RV, isoladas de casos clínicos de diarreia, que apresentavam grande homologia genética com os genogrupos de espécies heterólogas (NAKAGOMI e NAKAGOMI, 1991, 1993).

Rotavirose

Epidemiologia da Rotavirose suína

A produção da carne suína no Brasil tem apresentado crescimentos progressivos ao longo dos últimos anos. Influenciaram no aumento da produtividade, as mudanças nos sistemas de produção para sítios e o aprimoramento observado em várias condutas que influenciam nas taxas de produção como aqueles relacionados à gestão das granjas, ao manejo, à nutrição e à sanidade dos plantéis (ABIPÉCS).

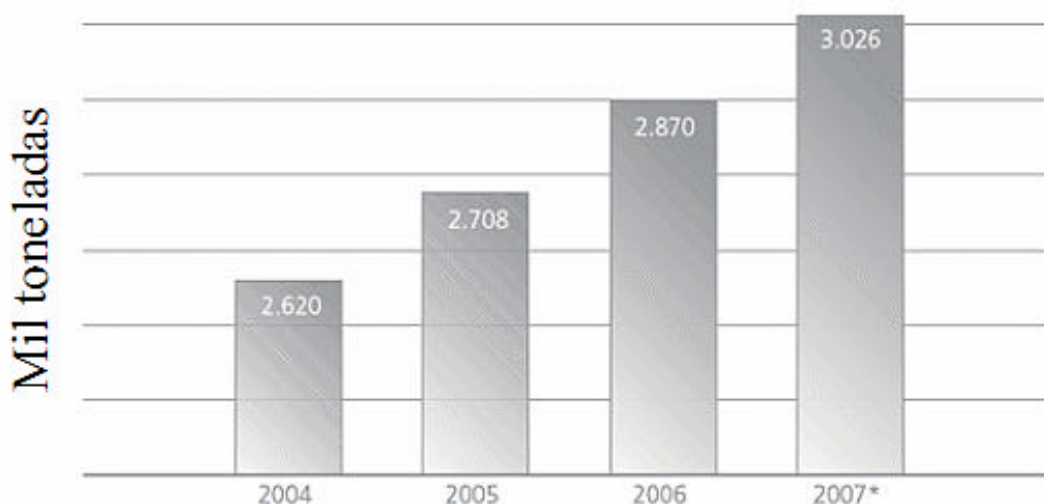


Figura 3. Evolução da produção da carne suína no Brasil no período de 2004 a 2007.

FONTE: ABIPÉCS

NOTA: * Estimativa

Vários estudos têm associado às enterites do período pré-desmame como um dos principais problemas sanitários em granjas de suínos. Como reflexos negativos dessas infecções são freqüentemente observados aumento da taxa de

mortalidade; redução na eficiência alimentar; atraso no desenvolvimento dos leitões e aumento no risco de ocorrência de diarreia pós-desmame (SVENSMARK et al., 1989; WITTUM et al., 1995).

Em todo o mundo onde a suinocultura é explorada de forma intensiva os RV representam a principal etiologia viral das diarreias endêmicas do pré e do pós-desmame dos leitões (FITZGERALD et al., 1988; DRIESEN et al., 1993; PONGSUWANNA et al., 1996; KIM et al., 1999; MARTELLA et al., 2001; DEWEY et al., 2003). As taxas de diagnóstico desse vírus variam consideravelmente em decorrência de diferenças metodológicas utilizadas para o diagnóstico, na definição da amostragem (*n*); da faixa etária dos animais incluídos no estudo e do tipo de manejo zootécnico-sanitário adotado nos plantéis. Entretanto, independentemente dessas variáveis, com frequência, os RV são identificados em um terço, ou até mais, das amostras de fezes de suínos incluídas em inquéritos epidemiológicos realizados em várias regiões do mundo com o objetivo de definir a etiologia das diarreias em leitões (LIPRANDI et al., 1987; FITZGERALD et al., 1988; GATTI et al., 1989; WIELER et al., 2001). O envolvimento direto dos RV nos episódios de diarreia é ratificado por sua maior frequência de detecção, em percentuais estatisticamente significativos em amostras fecais diarreicas, em comparação às amostras colhidas a partir de animais assintomáticos. Os quadros 1, 2, 3 e 4, apresentam a distribuição da frequência de diagnóstico de RV em fezes de suínos provenientes de diversas regiões geográficas de todo o mundo.

Quadro 1. Frequência de diagnóstico etiológico do rotavírus grupo A em fezes de leitões nos continentes Africano, Asiático e na Oceânia.

Local	Técnica	Nº de Amostras		Referência
		Total	% Positivas	
Africa do sul	ELISA	72	24,0	Geyer et al., 1995
Nigéria	ELISA	96	44,8	Atti e Ojeh, 1995
Coréia	Multiplex RT-PCR	157	13,3	Song et al., 2006
Índia	PAGE	41	9,7	Ghosh et al., 2006
Japão	Multiplex RT-PCR	153	67,3	Katsuda et al., 2006
Japão	Multiplex RT-PCR	116	65,5	Katsuda et al., 2006
Tailândia	Multiplex RT-PCR	175	22,3	Maneekarn et al., 2006
Austrália	ELISA/PAGE	2380	16,9	Driesen et al., 1993
Nova Guiné	ELISA/PAGE	29	55,2	Alpers et al., 1991

Multiplex RT-PCR (transcrição-reversa seguida da reação da polimerase em cadeia); ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis).

Quadro 2. Freqüência de diagnóstico etiológico do rotavírus grupo A em fezes de leitões na Europa:

Local	Técnica	Nº de Amostras		Referência
		Total	% Positivas	
Alemanha	ME	287	8,3	Wieler et al., 2001
Dinamarca	ELISA	638	34,6	Svensmark, 1983
Dinamarca	ELISA	1090	30,5	Svensmark et al., 1989
Espanha	Multiplex RT-PCR	125	66,9	Villena et al., 2003
Hungria	ME/ELISA	92	18,6	Nagy et al., 1996
Itália	ME/ELISA	751	16,1	Martella et al., 2007
Polônia	ELISA	531	31,8	Markowska et al., 1996
República Tcheca	ME/ELISA/PAGE/IF	60	33,3	Sesták e Musilová, 1994

Multiplex RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação da polimerase em cadeia); ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis); ME (microscopia eletrônica); IF (imunofluorescência).

Quadro 3. Frequência de diagnóstico etiológico do rotavírus grupo A em fezes de leitões nas Américas.

Local	Técnica	Nº de Amostras		Referência
		Total	% Positivas	
Argentina	ME/ELISA	156	38,4	Mattion et al., 1989
Cidade do México	PAGE	258	23,2	Morilla et al., 1991
Iowa	PAGE/ELISA	1048	9,0	Will et al., 1994
Quebec	PAGE	120	46,7	Magar et al., 1991
Trinidad e Tobago	LA	162	27,8	Kaminjolo e Adesiyun, 1994
Venezuela	ME	286	21,3	Utrera et al., 1984
Venezuela	ME/ELISA	136	27,9	Liprandi et al., 1987

Multiplex RT-PCR (transcrição reversa seguida da reação da polimerase em cadeia); ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis); ME (microscopia eletrônica); IF (imunofluorescência); LA (látex-aglutinação).

Quadro 4. Frequência de diagnóstico etiológico do rotavírus grupo A em fezes de leitões no Brasil.

Local	Técnica	Nº de Amostras		Referência
		Total	% Positivas	
Paraná	ELISA	117	34,2	Kroeff et al., 1999
São Paulo	PAGE /ELISA	302	21,5	San Juan et al., 1986
São Paulo	PAGE/ELISA	140	32,1	Bittencourt, Rácz, 1992
São Paulo	PAGE	174	10,9	Calderaro et al., 2001
SC,PR,SP,MG	PAGE/ELISA	330	26,4	Alfieri et al., 1991
SC,PR,RS	ELISA/PAGE	167	35,3	Rácz et al., 2000

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay); PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis).

Transmissão e Patogenia

Durante o período agudo da infecção os animais eliminam por meio das fezes grande quantidade ($10^{10} - 10^{12}$ partículas/grama de fezes) de partículas virais que contaminam o meio ambiente. Os RV apresentam ainda grande resistência no ambiente, permanecendo viáveis e com capacidade infectante por longos períodos de tempo sobre superfícies inanimadas, e também a produtos químicos utilizados como desinfetantes (MOE e SHIRLEY, 1982). Vários estudos demonstraram a influência da umidade relativa do ar na viabilidade das partículas virais (ADAMS et al., 1982; SATTAR et al., 1984). Pela transmissão fecal-oral os animais adultos possuem papel importante na disseminação do vírus na forma de portadores.

Os RV apresentam tropismo por enterócitos maduros das porções média e alta das vilosidades do intestino delgado de animais e de seres humanos jovens, podendo causar quadros graves de gastroenterite (LUNDGREN e SVENSSON, 2001). A multiplicação dos vírus nos enterócitos determina a morte e a descamação dessas células, que são substituídas por células imaturas, provenientes das criptas intestinais, que têm capacidade reduzida de absorção. Durante a diarreia ocorre diminuição da digestão de açúcares e da absorção de sais minerais e água, aumentando a gravidade da doença (KAPIKIAN e CHANOCK, 1996).

Outros achados patológicos também têm sido relacionados com a rotavirose como infiltração mononuclear na lâmina própria; distensão da cisterna do retículo endoplasmático; aumento mitocondrial e presença de microvilosidades esparsas e irregulares (BISHOP et al., 1973; MOON, 1997).

Estudos realizados em camundongos demonstraram a participação da proteína não-estrutural NSP4 dos RV, como uma enterotoxina, induzindo diarreia quando administrada pela via intraperitoneal ou intraluminal (BALL et al., 1996; ESTES e MORRIS, 1999). De acordo com Kapikian et al (2001), a proteína NSP4 interage com um receptor celular do epitélio intestinal, ativando uma via sinalizadora transducional que aumenta os níveis de Ca^{2+} , que por sua vez, leva ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática ao cloro e da secreção de cloro, induzindo a diarreia. Outros pesquisadores mencionam a participação da proteína NSP4 na estimulação do sistema nervoso entérico, pela liberação de aminas/peptídeo por meio de células endócrinas das vilosidades intestinais, pelo efeito da NSP4 no Ca^{2+} intracelular (LUNDGREN e SVENSSON, 2001).

Diagnóstico

A semelhança dos sinais clínicos das diarreias do pré e do pós-desmame em leitões, induzidos pelos vários potenciais patógenos entéricos, inviabilizam a definição da provável etiologia da infecção. Com isso, o diagnóstico conclusivo das rotavirose é estritamente laboratorial (VARGAS et al., 1990).

Devido à alta frequência da infecção e também à presença de animais adultos portadores, a sorologia, que é uma forma eficaz de diagnóstico para várias infecções, não tem utilidade prática na definição da etiologia das diarreias neonatais em animais de produção.

O diagnóstico etiológico conclusivo das rotavirose somente pode ser obtido por métodos que detectam a partícula viral ou componentes virais como

proteínas ou genoma. Com esse objetivo, vários métodos de diagnóstico foram desenvolvidos. Esses métodos variam consideravelmente em sensibilidade, especificidade, facilidade de execução, tempo necessário para a conclusão dos resultados e também no custo final do diagnóstico (ALFIERI et al., 1999).

Os vários métodos laboratoriais desenvolvidos para o diagnóstico etiológico da rotavirose apresentam vantagens e desvantagens. O uso de um ou outro método deve considerar os objetivos dos estudos. Em algumas situações somente a definição da etiologia do episódio diarreico é o aspecto desejado. Em outras, além da identificação do vírus pode-se ainda desejar a definição do grupo sorológico, genotipo ou mesmo a disponibilização de estirpes virais selvagens para estudos posteriores de caráter antigênico e molecular. Nessas situações, o uso de mais de uma metodologia diagnóstica faz-se necessário (MARKOWSKA et al., 1996; SONG et al., 2006).

A microscopia eletrônica é muito eficiente na detecção do RV, porém mostra-se inviável quando o diagnóstico envolve um grande número de amostras. A utilização de anticorpos para a detecção do RV por meio da imunomicroscopia eletrônica aumenta significativamente o limiar de detecção da técnica. A microscopia eletrônica é utilizada como prova final, quando outras metodologias apresentam resultados discrepantes, além de detectar RV atípicos que não possuem o antígeno VP6 comum do sorogrupo A (ALFIERI et al., 1999).

O isolamento do vírus em cultivo celular não é utilizado na rotina de diagnóstico do RV. A técnica é laboratoriosa, demorada e necessita de laboratórios que dominem a metodologia de cultivo de células. O desenvolvimento de linhagens celulares como MA 104 (células renais de macaco *Rhesus*) e HT 29

(células de tumor retal humano), e a utilização de enzimas como a tripsina, para ativação do inóculo viral, aumentam consideravelmente a frequência de isolamento do vírus. Porém, mesmo não sendo utilizada como técnica de diagnóstico de rotina, o isolamento do RV em cultivo celular é uma metodologia indispensável para estudos e pesquisas das características antigênicas e moleculares de estirpes virais e para a produção de antígenos empregados no diagnóstico e na elaboração de vacinas (SATO et al., 1981; CUKOR e BLACKLOW, 1984).

Vários outros métodos foram também padronizados para a detecção do RV como a fixação de complemento, imunofluorescência, radioimunoensaio, hemaglutinação e látex aglutinação. Entretanto, os testes imunoenzimáticos (ELISA) constituem um dos métodos mais difundidos no diagnóstico da rotavirose animal e humana devido ao seu limiar de detecção, facilidade de execução, baixo custo e rapidez nos resultados finais. Vários sistemas de ELISA foram desenvolvidos e alguns comercializados, porém essa metodologia, apesar de altamente sensível, pode apresentar resultados falso-negativos (JURE et al., 1988).

Os testes de ELISA podem utilizar tanto anticorpos monoclonais quanto policlonais para a detecção de antígenos de grupo ou sub-grupo (VP6) e sorogrupos (VP4 e VP7). Entretanto, devido à perda do antígeno VP4 durante a preparação ou estocagem do vírus, a especificidade para este antígeno é muito reduzida (ESTES e COHEN, 1989).

Dentre as técnicas moleculares a reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR) destaca-se como a mais difundida

para o diagnóstico do RV. A utilização de oligonucleotídeos iniciadores consensuais específicos possibilita a identificação do RV independentemente do grupo sorológico. Atualmente, sistemas de RT-PCR são utilizados na rotina laboratorial tanto para a detecção quanto, principalmente, a diferenciação dos grupos A, B e C de RV em amostras fecais diarréicas. Porém, como são disponíveis, inclusive comercialmente, outros métodos de diagnóstico com boa sensibilidade e especificidade e de menor custo e maior facilidade de elaboração, a RT-PCR é mais utilizada para estudos que envolvem a definição da epidemiologia molecular das rotaviroses, por meio da determinação dos genotipos G (VP7) e P (VP4) de estirpes de RV identificados em infecções entéricas tanto de seres humanos quanto de várias espécies animais (ALFIERI et al., 1996; LEITE et al., 1996).

O genoma segmentado, característico dos RV, permitiu a adaptação da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para a identificação desse vírus. A análise do RV por PAGE tem sido intensivamente utilizada na identificação de amostras virais tanto para o diagnóstico quanto em estudos epidemiológicos das infecções. A técnica de PAGE apresenta ainda uma particular importância nas infecções humanas e animais ocasionadas por RV atípicos, ou RV não pertencentes ao grupo A (KALIKA et al., 1976). A indisponibilidade de reagentes sorológicos para a detecção, e mesmo identificação dos RV atípicos, tornam a PAGE a técnica mais empregada para esta função, principalmente considerando o seu baixo custo quando comparada, por exemplo, com a microscopia eletrônica (KALICA et al., 1976).

Contudo, a eletroferotipagem dos RV por meio da PAGE, apesar de ser extremamente importante na definição de grupo ou eletroferogrupos, não possibilita a definição do sorotipo viral. Estirpes virais de um mesmo sorotipo podem apresentar perfis eletroforéticos diferentes, enquanto que estirpes com perfis semelhantes podem pertencer a diferentes sorotipos (BEARDS et al., 1984).

Profilaxia

A profilaxia das rotaviroses não se restringe apenas à adoção de medidas de caráter higiênico-sanitário, como ocorre em outras infecções entéricas causadas por bactérias ou parasitas. Algumas características dos RV como resistência da partícula viral as condições do meio ambiente e aos produtos químicos utilizados na desinfecção; a alta concentração de partículas virais excretadas no período agudo da doença; a presença de infecções subclínicas, animais assintomáticos e a possibilidade de transmissão interespecie, entre outras, fazem as rotaviroses se manifestarem de modo diferente das doenças entéricas mais comuns, causando grande impacto na saúde pública, mesmo em países desenvolvidos, e na sanidade de várias espécies de animais de produção, destacando-se entre elas os suínos e os bovinos (PAUL e LYOO, 1993; BERN e GLASS, 1994; CICIRELLO e GLASS, 1994; GLASS et al., 1994).

As variabilidades antigênicas e moleculares dos RV, ocasionadas pelo seu genoma dsRNA segmentado e expressa nos grupos sorológicos (A-G) e nos sorotipos e suas variantes, também representam um complicador na elaboração de imunógenos capazes de induzirem resposta imunológica duradoura (ALFIERI

et al., 1999). O prévio conhecimento dos sorotipos G e P de RV circulantes em uma região associado a sua distribuição temporal e/ou sazonal tem grande importância para o desenvolvimento de imunógenos mais eficientes (CONNER et al., 1994).

O uso de técnicas de diagnóstico que possibilitem a identificação dos diferentes grupos, eletroferotipos e genótipos dos RV, em associação com a implantação e avaliação periódica de programas de vacinação de rebanhos são condições preponderantes para o controle e profilaxia da rotavirose suína.

Referências:

ABIPECS, disponível em <http://www.abipecs.org.br>. Carne suína brasileira em 2006. Acessado em: 25/06/07.

ADAMS, D.J.; SPENDLOVE, J.C.; SPENDLOVE, R.S.; BARNETT, B.B. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.44, p.903-908, 1982.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; CONTE, L.E.; RESENDE, M. Evidências do envolvimento de rotavírus nas diarreias do pré e pós-desmame dos suínos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.43, p.291-300, 1991.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; FREITAS, J.C.; SILVA, C.A.; FREIRE, R.L.; BARROS, A.R.; BARREIROS, M.A.B.; MULLER, E.E. Ocorrência de *Escherichia coli*, Rotavirus, Picobiravirus e *Cryptosporidium parvum* em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **Semina Ci. Agr.**, v.15, p.5-7, 1994.

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

ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Detection of field isolates of human and animals group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide-probes. **J. Virol. Meth.**, v.83, p.35-43, 1999.

ALPERS, D.; SANDERS, R.C.; HAMPSON, D.J. Rotavirus excretion by village pigs in Papua New Guinea. **Aust. Vet. J.**, v.68, p.65-67, 1991.

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

ATTI, D.J.; OJEH, C.F. Subgroup determination of group A rotaviruses recovered from piglets in Nigeria. **Viral. Immunol.**, v.8, p.151-157, 1995.

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

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

BERN, C.; GLASS, R.I. Impact of diarrheal Diseases worldwide. In: **Viral Infections of the Gastrointestinal Tract** (Kapikian, A.Z, ed.), 2nd ed., Marcel Dekker, Inc., New York, p.01-26, 1994.

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

BOHL, E.H.; THEIL, K.W.; SAIF, L.J. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v.19, p.105-111, 1984.

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

CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactantes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arg. Inst. Biol.**, v.68, n.1, p. 29-34, 2001.

CHASEY, D.; BRIDGER, J.C.; McCRAE, M.A. A new type of atypical rotavirus and villous epithelial cell syncytia in piglets. **J. Comp. Pathol.**, v.100, p.217-222, 1986.

CICIRELLO, H.G.; GLASS, R.I. Current concepts of the epidemiology of diarrheal diseases. **Sem. Ped. Infect. Dis.**, v.5, p.163-167, 1994.

CONNER, M.E.; MATSON, D.O.; ESTES, M.K. Rotavirus vaccines and vaccination potential. **Top. Microbiol. Immun.**, v.185, p.285-337, 1994.

CUKOR, G.; BLACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. **Microbiol. Reviews**, v.48, p.157-179, 1984.

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

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

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

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

ESTES M.K. Rotaviruses and their replication. In: (eds.) **Fields Virology** (3rd). Raven Press, New York, p.1625-1655, 1996.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: D.M. Knipe and P.M. Howley (eds), **Fields Virology**, 4th edn, (Lippincott Williams.; Wilkins, Philadelphia), p.1747–1785, 2001.

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

ESTES, M.K.; MORRIS, A.P. A viral enterotoxin. A new mechanism of virus-induced pathogenesis. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.473, p.73-82, 1999.

FITZGERALD, G.R.; BARKER, T.; WELTER, M.W.; WELTER, C.J. Diarrhea in young pigs: Comparing the incidence of the five most common infections agents. **Vet. Med.**, v.83, p.80-86, 1988.

FLORES, J.; HOSHINO, Y.; BOEGGMAN, E.; PURCELL, R.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. Genetic relatedness among animal rotaviruses. **Arch. Virol.**, v.87, p.273-285, 1986.

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

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, p.1365-1373, 1992.

GENTSCH, J.R.; WOODS, P.A.; RAMACHANDRAN, M.; DAS, B.K.; LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.A.; KUMAR, R.; BHAN, M.K.; GLASS, R.I. Review of G and P typing results from a global collection of strains: Implications for vaccine development. **Infect. Dis.**, v.174, p.30-36, 1996.

GEYER, A.; SEBATA, T.; PEENZE, I.; STEELE, A. A molecular epidemiological study of porcine rotaviruses. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v.66, p.202-205, 1995.

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; BATTACHARYA, S.K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. Molecular characterization of a porcine Group A rotavirus strain with G12 genotype specificity. **Arch. Virol.**, v.151, p.1329-1344, 2006.

GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R.; SMITH, J. Rotavirus Vaccines: Success by Reassortment ?. **Science**, v.265, p.1389-1391, 1994.

GONZALEZ, S.A.; MATTION, N.M.; BELLINZONI, R.; SCODELLER, A.; BURRONE, O.R. Structure of rearranged genome segment 11 in two different rotavirus strains generated by a similar mechanism. **J. Gen. Virol.**, v.70, p.1329-1339, 1989.

GORZIGLIA, M.; LARREA, C.; LIPRANDI, F.; ESPARZA, J. Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polipeptide (45K) of rotavirus. **J. Gen. Virol.**, v.66, p.1889-1900, 1985.

GORZIGLIA, M.; GREEN, K.; NISHIKAWA, K.; TANIGUCHI, K.; JONES, R.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Sequence of the fourth gene of human rotavirus recovered from asymptomatic or symptomatic infections. **J. Virol.**, v.62, p.2978-2984, 1988.

GORZIGLIA, M.; LARRALDE, G.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Antigenic relationships among human rotaviruses as determined by outer capsid protein VP4. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.87, p.7155-7159, 1990.

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

GREGORI, F.; BRANDÃO, P.E.; CALDERARO, F.F.; JEREZ, J.A.; MUNFORD, V.; ROSALES, C.A.R.; RÁCZ, M.L. Preliminary results for porcine rotavirus genotypes from São Paulo State, Brazil. **Virus Rev. & Res.**, v. 5. p.175-176, 2000.

HARDY, M.E.; WOODE, G.N.; XU, Z.; GORZIGLIA, M. Comparative amino acid sequence analysis of VP4 for VP7 serotype 6 bovine rotavirus strains NCDV, B641, and UK. **J. Virol.**, v.65, p.5535-5538, 1991.

HENKE, H. Determinação do momento ótimo de venda de suínos empregando planilha eletrônica de cálculo. **Dissertação de Mestrado** apresentada à Faculdade de Engenharia de Produção da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil, 105p., 2000.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A.Z. Rotavirus Antigens. In: Ramig, R.F (Ed). **Curr. Top. Microbiol. Immun. (Rotaviruses)**. v. 185, p. 179-227, 1994.

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

ITURRIZA-GÓMARA, M.; GREEN, J.; BROWN, D.W.G.; DESSELBERG, U.; GRAY, J.J. Diversity within the VP4 gene of rotavirus P[8] strains: implications for reverse transcription-PCR genotyping. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.898-901, 2002.

JOHNSON, M.E.; PAUL, P.S.; GORZIGLIA, M.; ROSENBUSCH, R. Development of specific nucleic acid probes for the differentiation of porcine rotavirus serotypes. **Vet. Microbiol.**, v.24, p.307-326, 1990.

JURE, M.N.; MORSE, S.S.; STARK, D.M. Identification of nonspecific reactions in laboratory rodent specimens tested by Rotazyme rotavirus ELISA. **Lab. Anim. Sci.**, v.38, p.273-278, 1988.

KALICA, A.R.; GARON, C.F.; WYATT, R.G.; MEBUS, C.A.; VAN KIRK, D.H.; CHANOCK, R.M.; KAPIKIAN, A.Z. Differentiation of human and calf reovirus-like agents associated with diarrhea using polyacrylamide gel electrophoresis of RNA. **Virology**, v.74, p.86, 1976.

KALICA, A.R.; FLORES, J.; GREENBERG, H.B. Identification of the rotaviral gene that codes for haemagglutination and protease-enhanced plaque formation. **Virology**, v.125, p.194-205, 1983.

KAMINJOLO, J.S. ; ADESIYUN A.A. Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. **Br. Vet. J.**, v.150, p.293-299, 1994.

KANG, G.; KELKAR, S.D.; CHITAMBAR, S.D.; RAY, P.; NAIK, T. Epidemiological profile of rotaviral infection in India: challenges for the 21st century. **J. Infect. Dis.**, v.192, p.120-126, 2005.

KAPIKIAN, A.Z. ; CHANOCK, R.M. Rotaviruses, In: Fields, B.N.; Knipe, M.; Chanock, R.M.; Hirsch, M.S.; Melnick, J.L.; Monath, T.P. Roizman, B. (eds) **Virology**, 2nd ed. Ravens, New York, p.1353-1404, 1990.

KAPIKIAN, A.Z. ; CHANOCK, R.M. Rotaviruses In: Fields, B.N.; Knipe, D.M.; HOWLEY, P.M. **Field's Virology**. 3.ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, p.1657-1708, 1996.

KAPIKIAN, A. Z., HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), **Fields virology**, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. p.1787–1883, 2001.

KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.18, p.350-354, 2006.

KIN, O.; CHAE, C.; KWEON, C.H. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded intestinal tissues. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.11, p.458–462, 1999.

KHAMRIN, P.; MANEEKAM, N.; PEERAKOME, S.; CHAIN-IT, W.; YAGYU, F.; OKITSU, S.; USHIJIMS, H. Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new

phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. **Virology**, v.10, p.243-252, 2007.

KROEFF, S.S.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M.L.; HAYASHI, Y. Caracterização sorológica e molecular de rotavirus suíno no Paraná – Brasil. **Arch. Vet. Sci.**, v.4, p.123-127, 1999.

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

LIPRANDI, F.; GARCIA, D.; BOPTERO, L.; GORZIGLIA, M.; CAVAZZA, M.E.; PÉREZ-SCHAEEL, I.; ESPARZA, J. Characterization of rotaviruses isolated from pigs with diarrhoea in Venezuela. **Vet. Microbiol.**, v.13, p.37-45, 1987.

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

MACKOW, E.R.; SHAW, R.D.; MATSUI, S.M.; VO, P.; DANG, M.N.; GREENBERG, H.B. The rhesus rotavirus gene encoding protein VP3: location of amino acid involved in homologous and heterologous rotavirus neutralization and identification of a putative fusions region. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.85, p.645-649, 1988.

MAGAR, R.; ROBINSON, Y.; MORIN, M. Identification of Atypical Rotaviruses in Outbreaks of Preweaning and Postweaning Diarrhea in Quebec Swine Herds. **Can. J. Vet. Res.**, v.55, p.260-263, 1991.

MANEEKARN, N.; KHAMRIN, P.; CHAN-IT, W.; PEERAKOME, S.; SUKCHAI, S.; PRINGPRAO, K.; USHIJIMA, H. Detection of rare G3P[19] porcine rotavirus strains in Chiang Mai, Thailand, provides evidence for origin of the VP4 genes of Mc323 and Mc345 human rotaviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.4113-4119, 2006.

MARKOWSKA, D.I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSKAK, Z. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.19, p.219-232, 1996.

MARTELLA, V.; PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; FERARI, M.; LASIO, M.N.; BUONAVOGLIA, C. Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v.8, p.129-132, 2001.

MARTELLA, V.; CIALET, M.; BANVAI, K.; LORUSSO, E.; ARISTA, S.; LAVAZZA, A.; PESSOTTI, G.; DECARO, N.; CAVALLI, A.; LUCENTE, M.S.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAMERO, M.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) Genotype in Italian swine herds. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p.577-580, 2007.

MATSUDA, Y.; ISEGAWA, Y.; WOODE, G.N.; ZHENG, S.; KAGA, E.; NAKAGOMI, T.; UEDA, S.; NAKAGOMI, O. Two-way cross-neutralization mediated by shared P (VP4) serotype between bovine rotavirus strains with distinct G (VP7) serotypes. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.354-358, 1993.

MATTION, N.; BELLINZONI, R.; BLACKHALL, J.; LA TORRE, J.; SCODELLER, E. Antigenic characterization of swine rotaviruses in Argentina. **J. Clin. Microb.**, v.27, p.795-798, 1989.

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

MATTHEWS, R.E.F. The classification and nomenclature of viruses. Summary of results of meetings of the International Committee on Taxonomy of Viruses in Hague. **Intervirology**, v.11, p.133-135, 1979.

MIDTHUN, K. ; KAPIKIAN, A.Z. Rotavirus vaccine: an Overview. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.9, p.423-434, 1996.

McNULTY, M.S.; TODD, D.; ALLAN, G.M.; McFERRAN, J.B.; GREENE, J.A. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups. **Arch. Virol.**, v.81, p.113-121, 1984.

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

MOON, H.W. Comparative histopathology of intestinal infections. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.412, p.01-19, 1997.

MORILLA, A.; ARRIAGA, C.; RUIZ, A.; MARTINEZ, A.G.; CIGARROA, R.; VELAZQUEZ, A. Association between diarrhoea and shedding of group A and atypical groups B to E rotaviruses in suckling pigs. **Ann. Rech. Vet.**, v.22, p.193-200, 1991.

NAGESHA, H.S.; HOLMES, I.H. New porcine rotavirus serotype antigenically related to human rotavirus serotype 3. **J. Clin. Microbiol.**, v.26, p.171-174, 1988.

NAGY, B.; NAGY, G.; MEDER, M.; MOCSÁRI, E. Enterotoxigenic *Escherichia coli*, rotavirus, porcine epidemic diarrhoea vírus, adenovirus and calici-like vírus in porcine postweaning diarrhoea in Hungary. **Acta. Vet. Hung.**, v.44, p.09-19, 1996.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. **Arch. Virol.**, v.120, p.43-55, 1991.

NAKAGOMI, O.; NAKAGOMI, T. Interspecies transmission of rotaviruses studies from the perspective of genogroup. **Microbiol. Immunol.**, v.37, p.337-348, 1993.

OFFIT, P.A.; BLAVAT, G. Identification of two rotavirus genes determining neutralization specificities. **J. Virol.**, v.57, p.376-378, 1986.

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

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

PALOMBO, E.A.; BISHOP, R.F.; COTTON, R.G.H. Intra- and inter-season genetic variability in the VP7 gene of serotype 1 (monotype 1a) rotavirus clinical isolates. **Arch. Virol.**, v.130, p.57-69, 1993.

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

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

PRASAD, B.V.V.; CHIU, W. Structure of rotavirus. In: Ramig, R.F. (Ed). **Curr. Top. Microbiol. Immun.**, v.185, p.01-27, 1994.

PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: Detection of a G10 porcine rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.1050-1057, 1996.

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

RUIZ, A.M.; LÓPEZ, I.V.; LÓPEZ, S.; ESPEJO, R.T.; ARIAS, C.F. Molecular and antigenic characterization of porcine rotavirus YM, a possible new rotavirus serotype. **J. Virol**, v.62, p.4331-4336, 1988.

SAIF, L.J.; JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of Humans and Animals. In: RAMIG, R. F. (Ed.). **Current Topics in Microbiology and Immunology (Rotaviruses)**, v.185, p.339-371, 1994.

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

SATTAR, S.A.; RAPHAEL, R.A.; SPRINGTHORPE, V.S. Rotavirus survival in conventionally treated drinking water. **Can. J. Microbiol.**, v.30, p.653-656, 1984.

SATO, K.; INABA, Y.; SHINOZAKI, T.; FUJII, R.; MATUMOTO, M. Isolation of human rotavirus in cell cultures. **Arch. Virol.**, v.69, p.155-160, 1981.

SESTÁK, K. ; MUSILOVÁ, J. Isolation of rotavirus from naturally infected piglets. **Acta Virol.**, v.38, p.27-30, 1994.

SCHROEDER, B.A.; STREET, J.E.; KALMAKOFF, J.; BELLAMY, A.R. Sequence relationships between the genome segments of human and animal rotavirus strains. **J. Virol.**, v.43, p.379-385, 1982.

SHAW, A.L.; ROTHNAGEL, R.; CHEN, D.; RAMIG, R.F.; CHIU, W.; PRASAD, B.V.V. Three-dimensional visualization of the rotavirus hemagglutinin structure. **Cell**, v.74, p.693-701, 1993.

SILVA, C.A.; BRITO, G.B.; MORAES, N.; AMARAL, A.L. Ecopatologia da diarreia pós-desmame em granjas de suínos da região norte do Paraná, Brasil. **Ci. Rural**, v.29, p.39-43, 1999.

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

SVENSMARK, B.; NIELSEN, K.; DALSGAARD, K.; WILLEBERG, P. Epidemiological studies of piglet diarrhea in intensively managed Danish sow herds. **Acta. Vet. Scand.**, v.30, p.63-70, 1989.

SVENSMARK, B. Prevalence rate of porcine rotavirus in Danish swine herds. **Ann. Rech. Vet.**, v.14, p.433-436, 1983.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, S.; URASAWA, T. Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses. **J. Gen. Virol.**, v.66, p.1045-1053, 1985.

TODD, D. ; McNULTY, M.S. Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gel. **Avian. Pathol.**, v.15, p.149, 1986.

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

VARGAS, J.D.; HERNÁNDEZ, H.; ANES, F. Incidencia de rotavírus en las diarreas de la costa oriental del lago Maracaibo, Venezuela. **Vet. Mex.**, v.21, p.123-127, 1990.

VILLENA, C.; SENOUSY, W.M.E.; ABAD, F.X.R.M.P.; BOSCH, A. Group A Rotavirus in Sewage Samples from Barcelona and Cairo: Emergence of Unusual Genotypes. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.3919–3923, 2003.

ZABEREZHNY, A.A.; LYOO, Y.S.; PAUL, P.S. Prevalence of P types among porcine rotaviruses using subgenomic VP4 gene probes. **Vet. Microbiol.**, v.39, p.97-110, 1994.

WIELER, L.H.; LLEFF, A.; HERBEST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLOS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.**, v.48, p.151-159, 2001.

WILL, L.A.; PAUL, P.S.; PROESCHOLDT, T.A.; AKTAR, S.N.; FLAMING, K.P.; JANKE, B.H. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.6, p.416-22, 1994.

WITTUM, T.E.; DEWEY, C.E.; HURD, H.S.; DARGATZ, D.A.; HILL, G.W. Herd and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 1- 3 days of age. **Swine Health Prod.**, v.3, p. 99-104, 1995.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- ? Avaliar a ocorrência da rotavirose no complexo diarreia neonatal suína, por meio da análise por EGPA de amostras de fezes de leitões lactentes provenientes de rebanhos suinícolas não-vacinados de distintas regiões geográficas brasileiras.

2.2. Objetivos específicos

- ? Determinar a frequência de diagnóstico do RV suíno grupo A em fezes diarreicas e normais de leitões lactentes;
- ? Determinar a idade de maior ocorrência da infecção pelo RV suíno grupo A em leitões lactentes;

3. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Frequência de diagnóstico do rotavírus grupo A em leitões lactentes de rebanhos suínos não-vacinados.

Introdução

As diarreias em leitões lactentes são o principal problema sanitário de caráter endêmico na fase de maternidade em granjas de suínos de todo o mundo (SVENSMARK et al., 1989). Os episódios de diarreia neonatal ocasionam prejuízos econômicos, diretos e indiretos, consideráveis à suinocultura intensiva, particularmente devido ao custo com o tratamento, à maior predisposição a outras infecções como os problemas respiratórios, a desuniformidade dos lotes à desmama e também devido à morte dos animais (ALFIERI et al., 1991).

As causas das diarreias em leitões são multifatoriais e multietiológicas. Fatores relacionados às falhas no manejo zootécnico e sanitário e a presença de microrganismos enteropatogênicos são fatores predisponentes à infecção em animais jovens. Várias classes de microrganismos como bactérias (*E. coli*, *Clostridium perfringes* tipo C), protozoários (*Criptosporidium* sp, *Isospora suis*) e vírus (rotavírus, coronavírus, calicivírus) atuando em infecções singulares e, principalmente, em associação podem ser responsáveis por enterites em leitões (DRIESEN et al., 1993; ALFIERI et al., 1994; CALDERARO et al., 2001; WIELER et al., 2001).

Em todo o mundo o rotavírus é a principal etiologia viral de diarreia em mamíferos jovens e em algumas espécies aviárias (PONGSWUANNA et al., 1996;

KIM et al., 1999; DEWEY et al., 2003; TAMEHIRO et al., 2003). Os rotavírus pertencem à família *Reoviridae*, apresentam simetria icosaédrica com diâmetro de 70-90 nm, genoma composto por 11 segmentos de RNA fita dupla (dsRNA), capsídeo formado por três camadas concêntricas de proteínas e não possuem envelope lipoproteico. Com base no antígeno comum de grupo, a proteína VP6, os rotavírus são classificados antigenicamente em sete sorogrupos (A-G). Uma importante característica dos RV pertencentes ao sorogrupo A é a co-migração dos segmentos genômicos 7-8-9, em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), (ESTES, 1996).

Em suínos os rotavírus grupo A estão envolvidos diretamente nos episódios de diarreia que ocorrem tanto em animais lactentes quanto recém-desmamados em todo o mundo (PONGSWUANNA et al., 1996; KIM et al., 1999; DEWEY et al., 2003) e também no Brasil (SAN JUAN et al., 1986; GATTI et al., 1989; BITTENCOURT e RÁCZ, 1992; ALFIERI et al., 1991; ALFIERI et al., 1999; KROEFF et al., 1999).

Para o diagnóstico do rotavírus, várias técnicas foram desenvolvidas para detectar a partícula viral (cultivo celular, microscopia eletrônica, imunomicroscopia eletrônica), antígenos (ELISA, látex aglutinação, imunofluorescência direta) e o genoma viral (PAGE, RT-PCR). Todos esses métodos, que variam em especificidade e sensibilidade, apresentam vantagens e desvantagens (JURE et al., 1988; ALFIERI et al., 1996; MARKOWSKA et al., 1996).

Quando o diagnóstico é realizado em um grande número de amostras, como em inquéritos epidemiológicos, a sensibilidade e a especificidade da técnica, o baixo custo e a praticidade de execução são características que devem ser avaliadas na

seleção do método a ser utilizado. A técnica de EGPA seguida de coloração pela prata, apresenta todas as características necessárias para a sua utilização em larga escala. Adicionalmente, por meio da análise do perfil de migração dos 11 segmentos genômicos dos rotavírus, essa técnica possibilita a identificação dos grupos A, B e C de rotavírus, bem como a análise do eletroferotipo predominante na amostra (KALICA et al., 1983; MARKOWSKA et al., 1996).

No Brasil, a suinocultura é um importante segmento do agronegócio e destaca-se na cadeia de produção de carnes, tanto para o consumo interno quanto para o mercado externo. A identificação e o controle de doenças endêmicas que afetam a produtividade, assim como as diarreias que ocorrem na maternidade, podem contribuir com a redução nos custos da produção de leitões, proporcionando maior rentabilidade à criação (HENKE, 2000).

Apesar da importância da rotavirose nas infecções entéricas neonatais em todo o mundo, no Brasil a maioria dos estudos epidemiológicos restringe-se a um número pequeno de amostras ou em uma região geográfica muito restrita. (GATTI et al., 1989; KROEFF et al., 1999; CALDERARO et al., 2001).

O presente trabalho teve como objetivo determinar a frequência de diagnóstico de rotavírus suíno grupo A, pela técnica de EGPA, em granjas localizadas em cinco estados brasileiros, e fornecer dados epidemiológicos da infecção ao longo das quatro semanas de vida dos leitões.

Material e Métodos

Amostras de fezes:

No período de julho de 2004 a abril de 2007 foram colhidas 681 amostras de fezes de leitões lactentes com uma a quatro semanas de idade, sendo 428 amostras provenientes de leitões com diarreia e 253 de animais assintomáticos, que constituíram o grupo controle. As amostras eram provenientes de 130 granjas com sistema intensivo de criação localizadas em 80 municípios de cinco Estados (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso) e duas regiões geográficas (Sul e Centro-oeste), consideradas as principais regiões produtoras de suíno do Brasil. No momento da colheita das amostras de fezes, nenhuma das granjas avaliadas utilizava esquema de vacinação contra o rotavírus grupo A para a profilaxia das diarreias neonatais. A distribuição das amostras avaliadas de acordo com a sua procedência é apresentada no Quadro 1.

Vírus e Células:

O controle positivo utilizado na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) foi a estirpe OSU amplificada em células MA-104, mantidas em meio de cultura celular mínimo essencial Dulbecco? suplementada com soro fetal bovino 8%. Após visualização de efeito citopático característico de rotavírus, a monocamada celular juntamente com o meio de cultura foram submetidos a três ciclos rápidos de congelamento/descongelamento. Alíquotas de 500?l que

correspondem a uma dose foram mantidas a -20°C e utilizadas como controle positivo na técnica de EGPA (SATO et al., 1981).

Extração do RNA:

A partir de uma suspensão fecal a 20% (p/v) em tampão Tris/ Ca^{++} (50 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; 1,5 mM 2-mercaptoetanol; 3 mM CaCl_2) as amostras foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 15 min a 4°C . Alíquotas de 300 μL do sobrenadante foram tratadas com SDS, concentração final 1%, e incubadas por 30 min a 56°C . Para a extração do ácido nucléico foi utilizada uma associação das técnicas de fenol / clorofórmio / álcool isoamílico e sílica / isoticianato de guanidina (ALFIERI et al., 2006) fenol/clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1), descrita por Sambrook e Russel, (2001). O RNA foi eluído em 30 μL de água ultra-pura estéril e utilizado na técnica de EGPA.

Eletroforese em gel de poliacrilamida - EGPA:

A técnica de EGPA (7,5%), seguida de coloração pela prata, foi realizada de acordo com os procedimentos descritos por Herring et al. (1982) e Pereira et al. (1983), respectivamente.

Análise estatística:

O teste do qui-quadrado (χ^2), com nível de significância de 5%, foi utilizado para avaliar a diferença entre amostras positivas e negativas para rotavírus grupo A e variáveis como característica das fezes (diarréica/normal) e a faixa

etária dos animais. A análise estatística foi realizada no *software* Epi Info™, versão 6.04d (DEAN et al., 1998).

Resultados e Discussão

Das 681 amostras fecais analisadas foi possível a identificação de rotavírus com perfil eletroforético do grupo A 193 (28,3%) amostras. A frequência de 36,7% (157/428) de diagnóstico de rotavírus em amostras de fezes de leitões com quadro clínico de diarreia foi significativa ($p=0,0001$) em relação à frequência (36/253) de positividade encontrada nas amostras de fezes colhidas de leitões assintomáticos e que constituíram o grupo controle. Demonstrou-se uma chance de 3,49 vezes de positividade para a rotavirose em fezes diarreicas do que em fezes normais (Tabela 1).

O rotavírus foi identificado em fezes de leitões lactentes da primeira a quarta semanas de vida (Tabela 2). Considerando a amostragem total ($n=681$) não houve predomínio na frequência de diagnóstico em relação às faixas etárias avaliadas.

Porém quando as amostras foram estratificadas segundo a característica das fezes (diarreica/normal) houve uma diferença significativa ($p=0,0018$) em relação à faixa etária quanto à positividade para rotavírus em animais com fezes diarreicas, sendo que a quarta semana foi a mais prevalente (54,7%). Ao contrário não houve diferença significativa ($p=0,054$) quando as mesmas variáveis foram analisadas em fezes normais (Tabelas 2 e 3).

Em todo o mundo, a rotavirose é considerada uma das principais infecções entéricas de leitões lactentes (GHOSH, et al., 2006; KATSUDA et al., 2006; MARTELLA et al., 2007). No Brasil, os estudos conduzidos com o objetivo de avaliar a frequência de diagnóstico do rotavírus suíno grupo A nos episódios de diarreia em leitões lactentes ainda são restritos e foram realizados ou em regiões geográficas bastante delimitadas ou em amostragens relativamente pequenas (KROEFF et al., 1999; RÁCZ, et al., 2000; CALDERARO et al., 2001). O presente trabalho, avaliou um número expressivo de amostras fecais diarreicas e normais de leitões lactentes, provenientes de rebanhos localizados em regiões geográficas brasileiras bastante distintas. Os resultados demonstraram a participação do rotavírus grupo A nos episódios de diarreia neonatal em suínos em todas as regiões estudadas demonstrando a sua ampla distribuição nos rebanhos suínos brasileiros.

Em estudos anteriores realizados no Brasil, na dependência da forma de constituição da amostragem e da técnica de diagnóstico utilizada, as frequências de amostras positivas para o rotavírus suíno grupo A variaram entre 10,9% e 34,2% (KROEFF et al., 1999; RÁCZ et al., 2000; CALDERARO et al., 2001). No presente estudo, que incluiu em sua amostragem apenas amostras provenientes de leitões lactentes e um percentual expressivo de amostras no grupo controle, a frequência de amostras positivas foi muito próxima (28,3%) às encontradas por estudos anteriores.

Tanto em animais quanto em seres humanos o diagnóstico do rotavírus grupo A é sempre correlacionado com o quadro clínico de diarreia (BARREIROS et al, 2003; ALFIERI et al., 2006; SERRAVALLE et al., 2007). A avaliação de um número significativo de amostras é um aspecto muito importante para obter uma estimativa

mais precisa da doença. O presente trabalho avaliou um número expressivo de amostras diarréicas (428/681) e de consistência normal (253/681).

Considerando apenas as amostras diarréicas o rotavírus foi identificado em 36,7% das amostras. Esse percentual foi superior a alguns estudos realizados no Brasil incluindo àqueles que utilizaram como método de diagnóstico a técnica de ELISA direto que, em comparação a PAGE apresenta maior sensibilidade (SVENSMARK et al, 1989; GEYER et al., 1995; KROEFF et al, 1999).

Outra evidência que o rotavírus está diretamente relacionado à presença de diarréia é que das 193 amostras positivas, 157 (81,3%) eram de fezes diarréicas e 36 (18,6%) de fezes normais. A frequência de 14,2% ($n=36$) de positividade obtida em amostras do grupo controle pode ser justificada pela presença do vírus nas fezes, anteriormente ao quadro clínico de diarréia (SVENSMARK et al., 1989). Como a colheita das amostras foi pontual e realizada apenas uma vez por granja não foi possível avaliar o período do início e do final do episódio de diarréia. Somente uma avaliação epidemiológica realizada de forma longitudinal, com o acompanhamento das leitegadas durante todo o período de maternidade, possibilitaria uma conclusão mais específica sobre a presença de rotavírus em fezes normais.

Com o objetivo de determinar a idade em que os leitões lactentes apresentam maior susceptibilidade à infecção pelo rotavírus os animais foram distribuídos em faixas etárias classificadas em semanas de vida. Como o desmame era realizado em praticamente todas as granjas após os 21 dias, os animais incluídos na quarta semana referem-se àqueles com idade superior a 21 dias, mas que devido ao manejo, para a formação de lotes uniformes na creche, ainda não haviam sido desmamados. Em todas as faixas etárias avaliadas foi

possível a identificação do rotavírus grupo A em fezes provenientes de animais assintomáticos, mas, principalmente de animais com diarreia, demonstrando a ampla disseminação da rotavirose no rebanhos avaliados. A maior frequência de diagnóstico positivo foi observada em animais com diarreia e idade superior a 21 e inferior a 28 dias. Nesse período, imediatamente anterior a desmama, o título de anticorpos passivos é o mais baixo desde o nascimento e a maturidade imunológica para uma resposta ativa ainda não é plena (ASKAA et al., 1983; DEWEY et al., 2003). Com isso, os animais nessa faixa etária tornam-se bastante susceptíveis às infecções entéricas e poderia justificar parcialmente a frequência de 54,7% de amostras diarreicas positivas para o rotavírus.

No período no qual os leitões apresentam os maiores títulos de anticorpos passivos, que incluiu os animais com até uma semana de vida, observou-se também alta frequência (32,3%) de amostras diarreicas positivas para o rotavírus. Alfieri et al. (1991) avaliaram por PAGE 330 amostras de fezes de leitões colhidas no período de 1987 a 1989 provenientes dos Estados do Paraná, Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais. Em animais com até uma semana de idade foi encontrada a frequência de 11,1% de amostras fecais positivas para o rotavírus. Algumas hipóteses poderiam justificar essa discrepância de resultados. As falhas de manejo com relação à assistência ao parto e à primeira mamada dos leitões que poderiam acarretar em falhas na transferência passiva de anticorpos e predispor alguns animais da leitegada à infecção precoce. Esses animais com diarreia aguda seriam então responsáveis pelo aumento da dose infectante do rotavírus no ambiente da baia da maternidade, predispondo os outros animais da leitegada a um maior desafio, que poderia sobrepujar a sua imunidade passiva.

Outra hipótese seria a infecção dos leitões recém-nascidos com estirpes de rotavírus de genótipos e/ou sorótipos distintos e para os quais a imunidade passiva não providenciase proteção heteróloga contra o sorótipo do vírus que está determinando a infecção neonatal.

A susceptibilidade à infecção pelo rotavírus em leitões com até uma semana de idade foi observada em experimentos conduzidos de forma semelhante, porém realizados em um intervalo de tempo que corresponde a 18-20 anos. Nesse período, todos os parâmetros utilizados para aferir a eficiência da produção na suinocultura brasileira evoluíram consideravelmente. Somente no que diz respeito aos leitões, nesse intervalo de praticamente duas décadas, alcançou-se um aumento expressivo em índices como número de leitões nascidos vivos por porca/ano, número de leitegadas/porca ano, peso dos leitões ao nascer, ganho de peso dos leitões na maternidade e, conseqüentemente, a desmama. Outros aspectos que também devem ser considerados é a redução na idade da marrã ao primeiro parto e a redução do intervalo entre partos. As matrizes parindo um número maior de leitões mais pesados e em intervalos menores pode influenciar diretamente na imunidade passiva tanto em termos quantitativos, representado pelo volume de colostro disponível para cada leitão, quanto qualitativo, ou seja, o título de anticorpos-específicos contra um microrganismo que é recebido por cada leitão da leitegada.

A situação comentada anteriormente é um paradoxo no qual a evolução de parâmetros da produção animal pode ser responsável pelo maior risco sanitário para o desenvolvimento de diarreias em leitões lactentes. Tanto o presente estudo quanto o realizado por Alfieri et al. (1991) foram conduzidos em granjas

tecnificadas, a maioria de ciclo completo, e com bom manejo sanitário. Porém, em ambos estudos os rebanhos avaliados não adotavam programa de controle e profilaxia da diarreia neonatal por meio de esquema de vacinação das matrizes no período que antecede ao parto. No período do primeiro experimento (ALFIERI et al., 1991) ainda não havia no mercado brasileiro vacinas para a imunização de suínos que contemplasse o rotavírus. No experimento atual, apesar de já serem disponíveis vacinas polivalentes que incluem até dois sorotipos de rotavírus suíno, nenhum dos rebanhos avaliados utilizavam essa conduta profilática.

A investigação epidemiológica conduzida nesse trabalho mostrou que a rotavírose suína está amplamente difundida nos rebanhos suínos das principais regiões produtoras do país, bem como a sua correlação direta com os episódios de diarreias que ocorrem em leitões lactentes. A maior frequência de diagnóstico positivo para o rotavírus grupo A em animais com diarreia foi observada em animais incluídos na categoria de três e quatro semanas de vida. Porém, a frequência de diagnóstico positivo em leitões com uma e duas semanas de vida, período em que os animais deveriam estar protegidos pela imunidade passiva, sugere que provavelmente fatores ligados à evolução de parâmetros zootécnicos de produtividade tenham proporcionado uma situação de maior risco sanitário também nessas faixas etárias. Considerando que as diarreias no período do pré-desmame dos leitões constituem o principal problema sanitário nessa fase da criação e também a alta frequência de diagnóstico do rotavírus grupo A em leitões lactentes com diarreia, programas de controle e profilaxia dessa virose devem ser implementados e monitorados, principalmente em rebanhos com alto desempenho zootécnico.

Quadro 1. Distribuição das amostras de fezes de leitões lactentes colhidas para o diagnóstico do rotavírus suíno grupo A por eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo com as características das fezes e o local de colheita, Brasil, 2004-2007.

ESTADO	MUNICÍPIOS	GRANJAS	AMOSTRAS DE FEZES		TOTAL
			DIARRÉICAS	NORMAIS	
PR	23	51	126	108	234
SC	15	22	99	57	156
RS	38	49	151	73	224
MS	1	3	15	9	24
MT	3	5	37	6	43
TOTAL	80	130	428	253	681

Tabela 1. Distribuição do resultado da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para a detecção do rotavírus suíno grupo A, de acordo com as características das fezes de leitões lactentes avaliados, Brasil : 2004-2007.

FEZES	EGPA		TOTAL
	POSITIVA (%)	NEGATIVA (%)	
DIARRÉICAS	157 (36,7)	271 (63,3)	428
NORMAIS	36 (14,2)	217 (85,8)	253
TOTAL	193 (28,3)	488 (71,7)	681

$p=0,0001$; OR=3,49 (2,29 ? OR ? 5,34)

Tabela 2. Distribuição das amostras de fezes diarréicas de leitões lactentes, positivas e negativas para o rotavírus suíno grupo A pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), de acordo a faixa etária dos animais, Brasil : 2004-2007.

IDADE / SEMANA	AMOSTRAS DE FEZES		TOTAL
	POSITIVAS (%)	NEGATIVAS (%)	
Primeira	41 (32,3)	86 (67,7)	127
Segunda	31 (28,2)	79 (71,8)	110
Terceira	44 (37,9)	72 (62,1)	116
Quarta	41 (54,7)	34 (45,3)	75
Total	157 (36,7)	271 (63,3)	428

($\chi^2=15$; $p=0,0018$)

Tabela 3. Distribuição das amostras de fezes provenientes de animais assintomáticos (controle) de leitões lactentes, positivas e negativas para o rotavírus suíno grupo A, pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, de acordo a faixa etária dos animais, Brasil: 2004-2007.

IDADE / SEMANA	AMOSTRAS DE FEZES		TOTAL
	POSITIVAS (%)	NEGATIVAS(%)	
Primeira	8 (8,3)	88 (91,7)	96
Segunda	9 (15,5)	49 (84,5)	58
Terceira	14 (24,1)	44 (75,9)	58
Quarta	5 (12,2)	36 (87,8)	41
Total	36 (14,2)	217 (85,8)	253

($\chi^2=7,62$; $p=0,054$)

Referências:

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; CONTE, L.E.; RESENDE, M. Evidências do envolvimento de rotavírus nas diarreias do pré e pós-desmame dos suínos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.43, p.291-300, 1991.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; FREITAS, J.C.; SILVA, C.A.; FREIRE, R.L.; BARROS, A.R.; BARREIROS, M.A.B.; MULLER, E.E. Ocorrência de *Escherichia coli*, Rotavírus, Picobimavírus e *Cryptosporídium parvum* em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **Semina Ci. Agr.**, v.15, p.5-7, 1994.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BEUTTEMULLER, E.A.; BRITO, B.G.; MÉDICI, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavírose suína na região Sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Semina Ci. Agr.**, v.20, p.5-11, 1999.

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

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, p.521-526, 2006.

ASKAA, J.; BLOCH, B.; BERTELSEN, G.; RASMUSSEN, K.O. Rotavirus associated diarrhoea in nursing piglets and detection of antibody against rotavirus in colostrum, milk and serum. **Nord. Vet. Med.**, v.35, p.441-447, 1983.

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

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

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.**, v.28, n.3, p.495-503, 1990.

CALDERARO, F.F.; BACCARO, M.R.; MORENO, A.M.; FERREIRA, A.J.P.; JEREZ, A.J.; PENA, H.J.F. Frequência de agentes causadores de enterites em leitões lactantes provenientes de sistemas de produção de suínos do Estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, v.68, n.1, p. 29-34, 2001.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D.; BURTON, A.H.; BRENDEN, K.A.; SMITH, D.C.; DICKER, R.C.; SULLIVAN, K.M.; FAGAN, R.F.; ARNE, T.G. 1998. **Epi Info versão 6.04.d**. Disponível em <www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/EI6dnj.htm>.

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

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

ESTES M. Rotaviruses and their replication. In: (eds.) **Fields Virology** (3rd). Raven Press, New York, p.1625-1655, 1996.

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

GEYER, A.; SEBATA, T.; PEENZE, I.; STEELE, A. A molecular epidemiological study of porcine rotaviruses. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v.66, p.202-205, 1995.

GHOSH, S.; VARGHESE, V.; SAMAJDAR, S.; BATTACHARYA, S.K.; KOBAYASHI, N.; NAIK, T.N. Molecular characterization of a porcine group A rotavirus strain with G12 genotype specificity. **Arch. Virol.**, v.151, p.1329-1344, 2006.

GORZIGLIA, M.; LARREA, C.; LIPRANDI, F.; ESPARZA, J. Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotavirus. **J. Gen. Virol.**, v.66, p.1889-1900, 1985.

HENKE, H. Determinação do momento ótimo de venda de suínos empregando planilha eletrônica de cálculo. **Dissertação de Mestrado** apresentada à Faculdade de Engenharia de Produção da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brasil, 105p., 2000.

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, p.473-477, 1982.

HOSHINO, Y.; KAPIKIAN, A.Z. Rotavirus Antigens. In: Ramig, R.F (Ed). **Curr. Top. Microbiol. Immun. (Rotaviruses)**. v.185, p.179-227, 1994.

JURE, M.N.; MORSE, S.S.; STARK, D.M. Identification of nonspecific reactions in laboratory rodent specimens tested by Rotazyme rotavirus ELISA. **Lab. Anim. Sci.**, v.38, p.273-278, 1988.

KALICA, A.R.; FLORES, J.; GREENBERG, H.B. Identification of the rotaviral gene that codes for haemagglutination and protease-enhanced plaque formation. **Virology**, v.125, p.194-205, 1983.

KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.18, p.350-354, 2006.

KIM, O.; CHAE, C.; KWEON, C.H. Monoclonal antibody-based immunohistochemical detection of porcine epidemic diarrhea virus antigen in formalin-fixed, paraffin-embedded intestinal tissues. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.11, p.458–462, 1999.

KROEFF, S.S.; MUNFORD, V.; RÁCZ, M.L.; HAYASHI, Y. Caracterização sorológica e molecular de rotavírus suíno no Paraná – Brasil. **Arch. Vet. Sci.**, v.4, p.123-127, 1999.

MARKOWASKA, D.I.; WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z.; PEJSK, Z. Evaluation of different methods (ELISA, IF, EM, PAGE) for the diagnosis of rotavirus infection in piglets. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.19, p.219-232, 1996.

MARTELLA, V.; CIALET, M.; BANVAI, K.; LORUSSO, E.; ARISTA, S.; LAVAZZA, A.; PESSOTTI, G.; DECARO, N.; CAVALLI, A.; LUCENTE, M.S.; CORRENTE, M.; ELIA, G.; CAMERO, M.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Identification of group A porcine rotavirus strains bearing a novel VP4 (P) genotype in Italian swine herds. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p.577-580, 2007.

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

PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: Detection of a G10 porcine rotavirus. **J. Clin. Microbiol.**, v.34, p.1050-1057, 1996.

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

SAIF, L.J.; JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of Humans and Animals. In: RAMIG, R. F. (Ed.). **Current Topics in Microbiology and Immunology (Rotaviruses)**, v.185, p.339-371, 1994.

SAMBROOK J.; RUSSEL D.W. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

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

SATO, K.; INABA, Y.; SHINOZAKI, T.; FUJII, R.; MATUMOTO, M. Isolation of human rotavirus in cell cultures. **Arch. Virol.**, v.69, p.155-160, 1981.

SERRAVALLE, K.; SANTOS, N.; SARDI, S.I.; SILVA, S.P.; RIBEIRO JUNIOR, H.C.; MATTOS, A.P.; CAMPOS, G.S. Molecular characterization of group A rotavirus isolates obtained from hospitalized children in Salvador, Bahia, Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.11, p.35-39, 2007.

SVENSMARK, B.; NIELSEN, K.; DALSGAARD, K.; WILLEBERG, P. Epidemiological studies of piglet diarrhea in intensively managed Danish sow herds. **Acta. Vet. Scand.**, v.30, p.63-70, 1989.

TAMEHIRO, C.Y., ALFIERI, A.F., MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in faecal samples from broiler chicken. **Braz. J. Microbiol.**, v.34, p.349-35, 2003.

WIELER, L.H.; LLIEFF, A.; HERBEST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLOS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.**, v.48, p.151-159, 2001.

4. CONCLUSÕES

4. CONCLUSÕES

- ? A taxa de detecção de 28,34% do RV suíno grupo A, por meio da técnica de EGPA, em uma coleção de fezes de suínos ($n=681$) provenientes de cinco estados brasileiros (MT, MS, PR, SC, RS) caracteriza a ampla disseminação desse vírus nos plantéis suínos brasileiros;
- ? A detecção do RV suíno grupo A em 37% ($p=0,0001$) das amostras de fezes diarréicas avaliadas demonstrou uma chance de 3,49 vezes ($2,29 \leq OR \leq 5,34$) para a detecção do vírus nestas amostras quando comparadas com as amostras de fezes normais (14,2%).
- ? O RV suíno grupo A pode ser encontrado em fezes diarréicas de leitões lactentes da primeira a quarta semanas de idade, porém a infecção foi mais prevalente ($p=0,001$) em animais na quarta semana de vida;
- ? No período e regiões estudados a rotavirose suína foi ocasionada pelo eletroferogrupo A do RV suíno.

ANEXO 1 - Lista de Reagentes

1. Acetona PA (PM 78,13) (Fluka®)
2. Ácido acético PA (PM 60,05) (Artquímica®)
3. Ácido aminoacético (PM 75,07) (Synth®)
4. Ácido bórico (PM 61,83) (Sicalab®)
5. Acrilamida (PM 71,08) (Gibco BRL®)
6. Agar Noble (Difco®)
7. Agarose (Gibco BRLA®)
8. Álcool etílico PA (PM 46,07) (Nuclear®)
9. Azul de bromofenol
10. Bisacrilamida (PM 154,2) (Sigma®)
11. Borohidreto de sódio (PM 37,83) (Sigma®)
12. Cloreto de cálcio
13. EDTA dissodium (PM 372,24) (Gibco BRL®)
14. Formaldeído PA (PM 30,03) (Synth®)
15. Hidróxido de sódio (PM 40,00) (Biotec®)
16. Isotiocianato de guanidina (PM 118,16) (Gibco BRL®)
17. Nitrato de prata PA (Symylar®)
18. Persulfato de amônio PA
19. SDS (dodecil sulfato de sódio)
20. Sílica (PM 60,08) (Sigma®)
21. Sódio fosfato dibásico anidro (PM 141,96)
22. Sulfato de amônio PA (PM 132,14) (Caal®)
23. TEMED
24. TRIS (PM 121,14) (Invitrogen®)
25. Uréia

ANEXO 2 - Soluções e Tampões

Tampão L6

- ✍ 120 g isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- ✍ 100 mL Tris-HCl 0,1 M pH 6,4
- ✍ 22 mL EDTA 0,2 M pH 8,0
- ✍ 2,6 mL Triton X 100

Tampão L2

- ✍ 120 g isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- ✍ 100 mL Tris-HCl 0,1 M pH 6,4

Tampão de corrida para eletroforese em gel de poliacrilamida

- ✍ 30 g TRIS
- ✍ 14,4 g ácido aminoacético (glicina)
- ✍ 1 L H₂O bd q.s.p.

Tampão estabilizador de rotavírus (TRIS/Ca++) 10X pH 7,4

- ✍ 12,12 g TRIS (0,89 mM)
- ✍ 2,2 g cloreto de cálcio (1,5 mM)
- ✍ 1 L H₂O bd q.s.p.

Fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)

- ✍ 25 mL fenol saturado
- ✍ 24 mL clorofórmio
- ✍ 1 mL álcool isoamílico

Sílica

- ✍ 60 g sílica
- ✍ 500 mL H₂O bd q.s.p.
- ✍ Agitar e permanecer em repouso por 24 h

- ✍ Desprezar 430 mL do sobrenadante por sucção
- ✍ Ressuspender a sílica em 500 mL H₂O bd q.s.p
- ✍ Permanecer em repouso por 5 h. Desprezar 400 mL do sobrenadante
- ✍ Adicionar 600 µL de HCL (32% p/v) ajustar pH (pH 2,0)
- ✍ Aliquotar e autoclavar

Lower TRIS pH 8,8

- ✍ 36,34 g TRIS
- ✍ 200 mL q.s.p. H₂O destilada

Upper TRIS pH 6,8

- ✍ 12,12 g TRIS
- ✍ 200 mL q.s.p. H₂O destilada

Solução Acrilamida/Bis-acrilamida

- ✍ 1,3 g bisacrilamida
- ✍ 50 g acrilamida
- ✍ 100 mL q.s.p. H₂O destilada

Solução Fixadora para gel de poliacrilamida

- ✍ 30 mL álcool etílico absoluto
- ✍ 1,5 mL ácido acético
- ✍ 300 mL H₂O destilada q.s.p

Solução corante para gel de poliacrilamida

- ✍ 0,55 g nitrato de prata
- ✍ 300 mL H₂O destilada q.s.p

Solução reveladora para gel de poliacrilamida

- ✍ 9 g hidróxido de sódio
- ✍ 2,5 mL formaldeído

- ✍ 300 ml H₂O destilada q.s.p
- ✍ 0,06 g borohidreto de sódio

Solução stop para gel de poliacrilamida

- ✍ 15 mL ácido acético
- ✍ 300 ml H₂O destilada q.s.p

Solução conservadora para gel de poliacrilamida

- ✍ 30 mL etanol
- ✍ 300 mL H₂O destilada q.s.p

Gel inferior (7,5%) para eletroforese em gel de poliacrilamida

- ✍ 5 mL Lower TRIS
- ✍ 3 mL Acrilamida/Bis-acrilamida
- ✍ 50 µL TEMED
- ✍ 0,56 mL persulfato de amônio 2%
- ✍ 11,44 mL H₂O bd

Gel superior (3,5%) para eletroforese em gel de poliacrilamida

- ✍ 2,50 mL Upper TRIS
- ✍ 0,70 mL Acrilamida/Bis-acrilamida
- ✍ 50 µL TEMED
- ✍ 0,60 mL persulfato de amônio 2%
- ✍ 6,20 mL H₂O bd

Tampão de amostra (eletroforese em gel de poli acrilamida)

- ✍ 6 g uréia
- ✍ 1 mL de 2-mercaptoetanol
- ✍ 0,2 mL azul de bromofenol 1%
- ✍ 2,5 mL solução TRIS HCl 0,5M pH 6,8

- ✍ 6 mL SDS 10% (dodecil sulfato de sódio)
- ✍ 20 mL q.s.p H₂O bidestilada

ANEXO 3 - Protocolo das Técnicas

Suspensões fecais – Extração bruta

1. Pesar 1 g de fezes em balança de precisão
2. Adicionar 9 mL de tampão TRIS/Ca 1X
3. Se amostras forem muito líquidas usar proporção 1:2
4. Homogeneizar
5. Calibrar tubos
6. Centrifugar a 3000 rpm / 10 min.
7. Identificar e estocar em frascos a -20°C

Extração do RNA fd rotavírus (EGPA)

1. Aliquotar 500 µL da suspensão fecal em tubo tipo “eppendorf ” identificado.
2. Adicionar 50 µL de SDS 10%.
3. Homogeneizar
4. Banho -maria 56°C / 20 min.
5. Centrifugar
6. Adicionar 500 µL de fenol-clorofórmio-alcool isoamílico.
7. Homogeneizar.
8. Banho -maria 56°C / 15 min.
9. Homogeneizar.
10. Centrifugar em alta rotação / 10 min.
11. Recolher sobrenadante em outro tubo tipo “eppendorf ” (não recolher fase intermediária)
OBS. A extração pode ser interrompida nesta fase, antes de iniciar o protocolo de BOOM et al., 1990.
12. Adicionar 900 µL de L6.
13. Agitar em temperatura ambiente / 10 min.
14. Spin.
15. Adicionar 30 µL de sílica.
16. Homogeneizar
17. Agitar em temperatura ambiente / 30 min. (tempo mínimo).
18. Centrifugar em alta rotação / 30 s.
19. Desprezar o sobrenadante por inversão em frasco de descarte contendo NaOH.
20. Adicionar 500 µL de L2
21. Homogeneizar.
22. Centrifugar em alta rotação / 30 s
23. Desprezar o sobrenadante por inversão em frasco de descarte contendo NaOH.
24. Repetir passos 20, 21, 22 e 23.

25. Adicionar 1 mL de álcool 70%.
26. Repetir passos 21 e 22.
27. Desprezar sobrenadante em descarte comum.
28. Repetir passos 25, 26 e 27.
29. Adicionar 1 mL de acetona.
30. Repetir passos 21, 22 e 27.
31. Secar o *pellet* de sílica por 20 a 30 min.
32. Adicionar 50 µL de água ultra-pura (MilliQ®).
33. Homogeneizar.
34. Banho-maria 56°C / 15 min.
35. Homogeneizar.
36. Centrifugar alta rotação / 2 min.
37. Recolher sobrenadante em tubos tipo eppendorf de 500 µL.

Montagem das placas de eletroforese e aplicação das amostras:

1. Placas de vidro, espaçadores e pente: lavar com água e sabão, secar e limpar com álcool.
2. Montar as duas placas de vidro separadas pelos espaçadores inferiores e laterais.
3. Colocar grampos
4. Selar as extremidades com agar 2%. Aguardar polimerização.
5. Adicionar gel inferior (gel separador) – após seu preparo adicionar imediatamente à placa até próximo da extremidade inferior do pente.
6. Adicionar água sobre o gel para verificar polimerização.
7. Após completa polimerização do gel inferior, retirar água com papel filtro e adicionar o gel superior (gel concentrador).
8. Colocar o pente para formação das canaletas.
9. Aguardar polimerização.
10. Após completa polimerização do gel, fixar cuidadosamente as placas a cuba de eletroforese.
11. Adicionar tampão de corrida nos reservatórios superior e inferior da cuba.
12. Retirar espaçador inferior e o pente.
13. Adicionar amostras nas canaletas – amostras: aliquotar 20 µl de amostra de RNA + 10 µl de tampão de amostra - em tubo tipo “ependorff” novo - banho-maria 56°C por 10 a 15 min.
14. Após adição de todas as amostras, ligar a fonte da eletroforese e ajustar a corrente (manter em 60 V 20 mA - aumentar a corrente para 100 V).
15. Aguardar a corrida eletroforética até a saída do corante azul de bromofenol do gel.

Coloração do gel com Nitrato de Prata (descrição de acordo com Herring et al., 1982)

1. Retirar as placas com o gel da cuba de eletroforese, abrir e retirar os espaçadores, restando somente o gel.
2. Transferir o gel para a solução fixadora por 30 min (o gel pode permanecer por mais tempo nesta solução).
3. Acrescentar a solução corante (nitrato de prata). Deixar o gel por 30 min nesta solução. Manter sob agitações periódicas.
4. Desprezar o corante, lavar o gel duas vezes com água destilada.
5. Acrescentar solução reveladora.
6. Manter na solução reveladora até aparecerem bandas.
7. Após visualização das bandas, interromper a revelação pela adição da solução STOP – por 15 min (mínimo).
8. Manter o gel em solução conservadora até a secagem e/ou fotografia.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)