



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

JOICE ELAINE TEIXEIRA CAMPANHA

**ESTUDO LONGITUDINAL DA INFECÇÃO DO ROTAVÍRUS C  
EM LEITEGADAS DE ATÉ UMA SEMANA DE IDADE**

---

Londrina  
2016

JOICE ELAINE TEIXEIRA CAMPANHA

**ESTUDO LONGITUDINAL DA INFECÇÃO DO ROTAVÍRUS C  
EM LEITEGADAS DE ATÉ UMA SEMANA DE IDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes Alfieri

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Campanha, Joice Elaine Teixeira .

Estudo Longitudinal da Infecção do Rotavírus C em Leitegadas de até uma Semana de Idade / Joice Elaine Teixeira Campanha. - Londrina, 2016.  
59 f. : il.

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Leitão - Tese. 2. Ordem de parto - Tese. 3. Incidência - Tese. 4. RVC - Tese. I. Alfieri, Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

JOICE ELAINE TEIXEIRA CAMPANHA

**ESTUDO LONGITUDINAL DA INFECÇÃO DO ROTAVÍRUS C EM  
LEITEGADAS DE ATÉ UMA SEMANA DE IDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alice Fernandes Alfieri  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

---

Prof. Dr. Luiz César da Silva  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 15 Julho de 2016.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal (LabVir) e no Laboratório Multiusuário de Saúde Animal, Unidade de Biologia Molecular (LAMSA / BioMol), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. 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**

Dedico este trabalho a Deus e a minha  
família!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, razão de tudo, meu amigo mais fiel nas horas difíceis, me deu a oportunidade de estar aqui hoje e me abençoou me concedendo entendimento e sabedoria, para conduzir esse trabalho.

Agradeço a minha família, meu esposo Jocemar dos Santos Monteiro, que me aturou e me apoiou sempre, mostrando seu amor por mim, a minha filha Rebeca Campanha Monteiro, que me ensinou a ver o mundo e amar de uma maneira diferente, sempre me alegrava com seu rostinho lindo, e seu jeitinho, sem você minha pequena isso não faria sentido, eu amo muito vocês.

Ao meus pais Elza M<sup>a</sup> Teixeira Campanha e Juvenato Marques Campanha, exemplos de pessoas, nas quais me inspiro todos os dias, obrigada por me conceder o privilégio de ser sua filha. Aos meus irmãos Julio Cesar Teixeira Campanha e Julieli Elisa Teixeira Campanha, por sempre me apoiarem e me aguentarem, aos meus avós Joaquim Teixeira Filho (*in memoriam*) e Natalina Cestali Teixeira, é difícil estar aqui sem o senhor meu vovozinho, mas, eu te agradeço pelo exemplo que foi, nunca vi tanta força e alegria em uma só pessoa, o senhor me ensinou a perseverar com alegria nos meus objetivos, muito obrigada. A todos os meus familiares que me ajudaram e apoiaram de alguma forma.

Aos meus orientadores professora Alice F. Alfieri e professor Amauri A. Alfieri, pelo ensinamento passado, pelos conselhos e pela confiança, obrigada por me aceitarem e me ampararem. Aos membros da banca. A todos os professores da UEL, pelos ensinamentos, aprendi muito nesses anos que passei aqui, e devo a todos vocês.

Aos colegas da família LABVIRAL, muito obrigada, pelas risadas, pelos puxões de orelha e pelos ensinamentos, vocês são demais. Gostaria de agradecer em especial a Elis Lorenzetti, que sempre me ajudou, a Sarah E. Crespo que sempre me ajudou quando precisei fazer algo que não podia quando estava grávida, a Flávia Possatti pela grande ajuda nessa dissertação, aos técnicos do laboratório Marcos Vinicius de Oliveira, Renilda Calabrio Cianca e Juliana T. Fritzen, pela ajuda, aos residentes, mestrandos, doutorandos, estagiários, enfim, a todos que de uma forma ou outra ajudaram para a realização desse trabalho.

Gostaria de agradecer também algumas pessoas que contribuíram para chegar até aqui, as minhas amigas Mércia de Seixas e Thais Agostinho pela

grande parceria, ao pessoal dos laboratórios de protozoologia, bacteriologia, micologia, leptospirose, zoonoses e saúde pública e todos do DMVP.

Meu sincero muito obrigada, que Deus possa retribuir a todos de alguma forma toda ajuda e apoio.

“Aquele que habita no esconderijo do  
Altíssimo, à sombra do Onipotente  
descansará.  
Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o  
meu refúgio, a minha fortaleza, e Nele  
confiarei.  
Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua  
direita, mas tu não serás atingido.”

Salmos 91:1-2,7

CAMPANHA, Joice Elaine Teixeira. **Estudo longitudinal da infecção do rotavírus C em leitegadas de até uma semana de idade**. 2016. 63fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

## RESUMO

A diarreia neonatal é um dos principais problemas sanitários que acomete a suinocultura. O rotavírus A (RVA) é considerado o RV mais frequentemente detectado em surtos de diarreia em leitões no mundo. No entanto, nos últimos anos, o rotavírus C (RVC) tem sido relatado em surtos de diarreia em leitões evidenciando a importância dessa espécie no desenvolvimento da rotavirose. O objetivo deste estudo foi avaliar a incidência da infecção pelo RVC em leitões neonatos com até sete dias de idade, durante cinco semanas. Para este estudo, 534 leitões provenientes de 50 leitegadas foram monitorados diariamente para a ocorrência de diarreia. Um total de 206 amostras de fezes diarreicas foram colhidas e classificadas de acordo com sua consistência (pastosa, semi-líquida e líquida). Alguns parâmetros de produção para as leitegadas e para os leitões também foram avaliados neste estudo. Todas as leitegadas foram classificadas de acordo com a ordem de parto (OP) das matrizes, em cinco categorias (OP1 a OP5). Com relação ao tamanho das leitegadas (TL), as leitegadas foram divididas em dois grupos, incluindo matrizes com até 10 leitões ( $TL \leq 10$ ) e matrizes com mais de 10 leitões ( $TL > 10$ ). De acordo com o peso ao nascer (PN) os leitões foram classificados em PN1 (1,2-1,3 kg) e PN2 ( $> 1,3$ -1,4 Kg). Todas as amostras fecais foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), com intuito de detectar o RNA fita dupla do RV, e as amostras com resultado inconclusivo e negativo na EGPA foram submetidas à amplificação parcial do gene VP6 do RVC. A análise estatística foi realizada por meio do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Dos 534 leitões monitorados 206 (38,6%) apresentaram diarreia, desses 71/206 (34,5%) foram positivos para RVC. A incidência de RVC foi de 71/534 (13,3%). De acordo com a consistência fecal a mais alta incidência de RVC ocorreu nas amostras fecais com consistência líquida (42,2%). Das 50 leitegadas monitoradas 33/50 (66%) das leitegadas apresentaram amostras de fezes positivas para RVC. De acordo com a ordem de parto, a incidência de RVC variou de 33,3% a 87,5%; o grupo com tamanho da leitegada  $TL > 10$  e o grupo de PN2 apresentaram maior incidência (73,5 e 71,0%, respectivamente) de RVC quando comparado com outros grupos avaliados. Contudo, nenhum dos parâmetros avaliados (OP1 a OP5;  $TL \leq 10$  e  $TL > 10$ ; e PN1 e PN2) foi observada diferença estatística significativa. A detecção de RVC em amostras de fezes diarreicas em todo período avaliado aumentou a carga viral no ambiente contribuindo para a disseminação do vírus para outras leitegadas e para outras faixas etárias presentes no rebanho. Além disso, este é o primeiro estudo longitudinal prospectivo sobre os aspectos epidemiológicos da infecção pelo RVC em leitões neonatos com até sete dias de idade.

**Palavras-chave:** Leitão. Ordem de parto. Incidência. RVC

CAMPANHA, Joice Elaine Teixeira. **A longitudinal study of rotavirus C infection in litters up to 1-week-old.** 63f. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2016.

## ABSTRACT

The neonatal diarrhea is a major sanitary problem in the Piglet Production Units. Porcine rotavirus (RVA) is considered the most frequently RV detected in piglets diarrhea outbreaks worldwide. However, the reports of rotavirus C (RVC) involved in diarrhea outbreaks in piglets showing the importance of that species in the development of rotavirus in very young piglets have been increased in the last years. Therefore, the objective of this study was to evaluate the incidence of infection in neonates RVC piglets up to seven days old, for five weeks. For this study, 534 piglets from 50 litters were monitored daily for the occurrence of diarrhea. A total of 206 diarrheic fecal samples were collected and classified according their score. Ten fecal samples with normal consistency were randomly collected from asymptomatic piglets from the same litters and used as negative controls. Some production parameters for the litters or piglets were also evaluated in this study. All litters were classified according the number of parities of sows in five categories of sow parity (SP 1 to 5). Regarding the size, the litters were further divided into two groups (Litter Size - LS) including litter having up to 10 piglets ( $LS \leq 10$ ) and litter having more than 10 piglets ( $LS > 10$ ). According to the birth weight (BW) the piglets were classified in BW1 (1.2 to 1.3 Kg) and BW2 (>1.3 to 1.4 Kg). All fecal samples were screened for dsRNA of RV by a silver stained-polyacrylamide gel electrophoresis (ss-PAGE), and samples with both inconclusive and negative results were submitted to partial RVC VP6 gene amplification. Statistical analysis was performed using chi-square test ( $\chi^2$ ). Of the 534 piglets monitored 206 (38.6%) had diarrhea, these 71/206 (34.5%) were positive for RVC. The incidence of RVC was 71/534 (13.3%). In the control group ( $n=10$ ) only 1 (10%) sample was positive. According the fecal consistency the highest frequency detection of RVC occurred in the liquid fecal samples (42.2%). When the results of RVC dsRNA detection were distributed by the litters evaluated in this study, 33/50 (66%) litters have positive fecal samples. According to the order of sow parity, the frequency of RVC detection varied from 33.3% to 87.5%; the litter size group  $LS > 10$  and the birth weight group 2 (>1.3 to 1.4 Kg) showed higher frequency (73.5% and 71.0%, respectively) of RVC detection when compared with other evaluated groups. However, in any of the evaluated parameters (SP1 to 5; LS1 and 2; and BW1 and 2) was observed significant difference between groups. Nevertheless, the detection of RVC in diarrheic fecal samples throughout all period evaluated increases viral load in the environment contributing to the spread of the virus to other litters and other age groups present in the herd. In addition, this is the first longitudinal study regarding epidemiological aspects of RVC infection in newborn piglets up to seven days old.

**Key words:** Piglets. Birth order. Incidence. RVC

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### 1. Revisão de Literatura

- Figura 1** Representação esquemática das estruturas do RV demonstrando as proteínas virais que compõem as camadas interna, intermediária e externa do capsídeo. ....18
- Figura 2 -** Perfil de migração eletroforético dos segmentos genômicos dos rotavírus A, B e C. Representação esquemática (esquerda) e fotografia do gel de poliacrilamida 7,5% (direita). ....24

## LISTA DE TABELAS

### 3. Artigo para publicação

- Table 1** – Fecal samples of piglets up to 1week old positive for porcine rotavirus C distributed according fecal consistency.....42
- Table 2** – Distribution of positive and negative litters up to 7-day-old for porcine rotavirus C infection according some parameters such as order of sow parity, litter size, and birth weight .....42

## LISTA DE QUADROS

### 1. Revisão de Literatura

<b>Quadro 1</b> – Detecção do rotavírus C em amostra de fezes de suínos com ou sem diarreia em infecção mista ou singular, de acordo com o país de origem.....	21
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
Ac	Anticorpo
APP	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
Aa	Aminoácido
DEPC	Dietil-pirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleotídeo-fosfatado
dsRNA	<i>Double-strand RNA</i> (Ácido ribonucleico fita dupla)
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático)
HPS	<i>Haemophilus parasuis</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
Kg	kilograma
ME	Microscopia eletrônica
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NSP	<i>non structural protein</i> (proteína não estrutural)
nt	Nucleotídeo
NTPase	Nucleosídeo trifosfatase
ORF	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PAGE / EGPA	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> / eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa
RV	Rotavírus
RVA	Rotavírus A
RVB	Rotavírus B
RVC	Rotavírus C
Tris	hidroximetil aminometano
µL	microlitro
VP	<i>viral protein</i> (proteína viral)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
1.1	Introdução.....	15
1.2	Diarreia neonatal X Mortalidade em suínos .....	16
1.3	Diarreias neonatais em suínos .....	16
1.4	Rotavírus.....	17
1.5	Epidemiologia do rotavírus.....	19
1.6	Epidemiologia do rotavírus C .....	20
1.7	diagnóstico do rotavírus .....	23
1.8	controle e profilaxia .....	24
1.9	Referências .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>3</b>	<b>ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO</b> .....	<b>37</b>
1.	Introduction .....	39
2.	Materials e methods.....	40
2.1	<i>Herd and sampling</i> .....	40
2.2	<i>Nucleic acid extraction</i> .....	40
2.3	<i>ss-PAGE</i> .....	41
2.4	<i>RT-PCR assay</i> .....	41
2.5	<i>Statistical analysis</i> .....	41
3.	Results .....	41
4.	Discussion .....	43
5	References .....	45
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>50</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>51</b>
	ANEXO A – Lista de reagentes.....	52
	ANEXO B – Soluções e tampões .....	54
	ANEXO C – Protocolos e técnicas .....	57



# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 Introdução

A cadeia produtiva de suínos no Brasil, a exemplo de outras modalidades produtivas do agronegócio brasileiro, vem crescendo significativamente nos últimos anos. Este crescimento é demonstrado quando se analisa os indicadores socioeconômicos do país, tais como o volume de exportação, a participação no mercado mundial, e a geração de empregos (diretos e indiretos), evidenciando que a exploração dessa atividade ocorre de forma econômica e competitiva (CALDERARO et al., 2001; GONÇALVES; PALMEIRA, 2006; ALFIERI et al., 2012). O Brasil se consolidou como o quarto maior produtor e exportador de carne suína do mundo, com 3,3 milhões de toneladas produzidas anualmente. Deste total, 600 mil toneladas são exportadas para 70 países. Dentre os estados brasileiros o Paraná, se destaca como o terceiro maior produtor de carne suína, tendo abatido em 2014 20,04% do abate total do país (ABPA, 2015).

A diarreia neonatal continua sendo um dos maiores problemas da suinocultura brasileira, causando grandes prejuízos econômicos ao setor (ALFIERI et al., 2012). Ao mesmo tempo, o Brasil alcançou um patamar ímpar quando o assunto é sanidade. Na suinocultura, o pleno controle da produção manteve o país livre nas últimas décadas de registros de duas doenças graves, a Diarreia Suína Epidêmica (PED) e a Febre Aftosa sendo a última de notificação obrigatória (ABPA, 2015).

A diarreia acomete principalmente leitões nas fases de maternidade e creche. Falhas na proteção passiva e imaturidade do sistema imune são os principais fatores de risco para leitões no pré-desmame (DEWEY et al., 2003; KATSUDA et al., 2006). Já no período de pós-desmame, a ocorrência de diarreia é influenciada pelas alterações de ordem social e alimentar a que esses animais são submetidos (SPENCER et al., 1989; PAUL; LYOO, 1993; KATOULI et al., 1995; MELIN et al., 2000; CALDERARO et al., 2001; ALFIERI et al., 2012).

A morbidade e a mortalidade em leitões causada pelas diarreias neonatais determinam prejuízos econômicos tanto na suinocultura nacional como mundial. Diarreia nos leitões nas fases de maternidade e também no pós-desmame podem aumentar os custos de produção, em decorrência dos gastos adicionais com mão de

obra e medicamentos, além da redução no ganho de peso dos leitões comprometidos e a presença de lotes heterogêneos ao desmame (SILVA et al., 1998; LINARES et al., 2009; ALFIERI; ALFIERI; BARRY, 2010; ALFIERI et al., 2012).

## **1.2 Diarreia neonatal X Mortalidade em suínos**

Tagliari e Brito (1998) observaram a ocorrência de diarreia em 1801 leitões lactentes, onde a maior ocorrência de diarreia e maior prejuízo econômico ocorreram na primeira semana de vida, com redução do ganho de peso diário por volta de 21% e mortalidade 0,51%. No estudo realizado por Brito e colaboradores, sobre as possíveis causas de mortalidade de leitões lactentes em granjas do Paraná, a diarreia ficou entre as cinco principais causas, onde a taxa de mortalidade perinatal foi de 11,28% e a diarreia foi responsável por 0,16% deste total (BRITO et al., 1995). Azevedo e colaboradores (2015) avaliaram a causa da morte de 2837 leitões lactentes e constataram que 6,7% das mortes foram devido à diarreia.

Em 2004, no Estado de São Paulo, Abrahão e colaboradores, observaram que a principal causa da morte de leitões por doenças, foi à síndrome diarreia com frequência de 1,1% do total de nascidos vivos, e sugeriram que as enterites infecciosas representam a principal causa de mortalidade de leitões no período pré-desmame. Em um estudo conduzido no Rio Grande do Sul, no período de 2010 a 2013, 215 matrizes com média de 516 leitões nascidos foram avaliadas e a taxa de mortalidade de leitões por diarreia foi de 1% (AIRES et al., 2014). Júnior e colaboradores (2010), no Estado do Mato Grosso, ao avaliarem a porcentagem de mortalidade em leitões com até seis dias idade, encontraram 11% de mortalidade por diarreia dos 48416 leitões nascidos vivos avaliados.

## **1.3 Diarreias neonatais em suínos**

A diarreia neonatal em suínos é caracterizada uma síndrome multifatorial e multietiológica, podendo estar envolvidos fatores ambientais, nutricionais, imunológicos e diferentes agentes etiológicos, como bactérias, parasitas, vírus e toxinas. (BRITO et al., 1995; TAGLIARI; BRITO, 1998; GREGORI et al., 2004; KATSUDA et al., 2006; ALFIERI et al., 2012).

Dentre os agentes etiológicos que causam enterite em suínos, o rotavírus (RV) é um dos principais envolvidos, ocasionando diarreia em leitões nas fases de maternidade e creche (ALFIERI et al., 2012). Quadros de diarreia por RV, em animais de produção assumem elevada importância em virtude do impacto econômico gerado no setor produtivo (ALFIERI; ALFIERI; BARRY, 2010).

A infecção causada pelo RV pode ser sintomática, geralmente observado nos animais de maternidade e creche, ou assintomática sendo estes animais considerados portadores e importantes transmissores deste vírus para indivíduos em outras fases de criação (PAUL; LYOO, 1993; ESTES; KAPIKIAN, 2013). As matrizes geralmente assintomáticas, durante o período do periparto também são consideradas importante fonte de infecção para os neonatos. A gravidade da doença pode estar relacionada à virulência da cepa infectante, carga viral, fatores ambientais e associação com outros patógenos (PAUL; LYOO, 1993; LINARES et al., 2009).

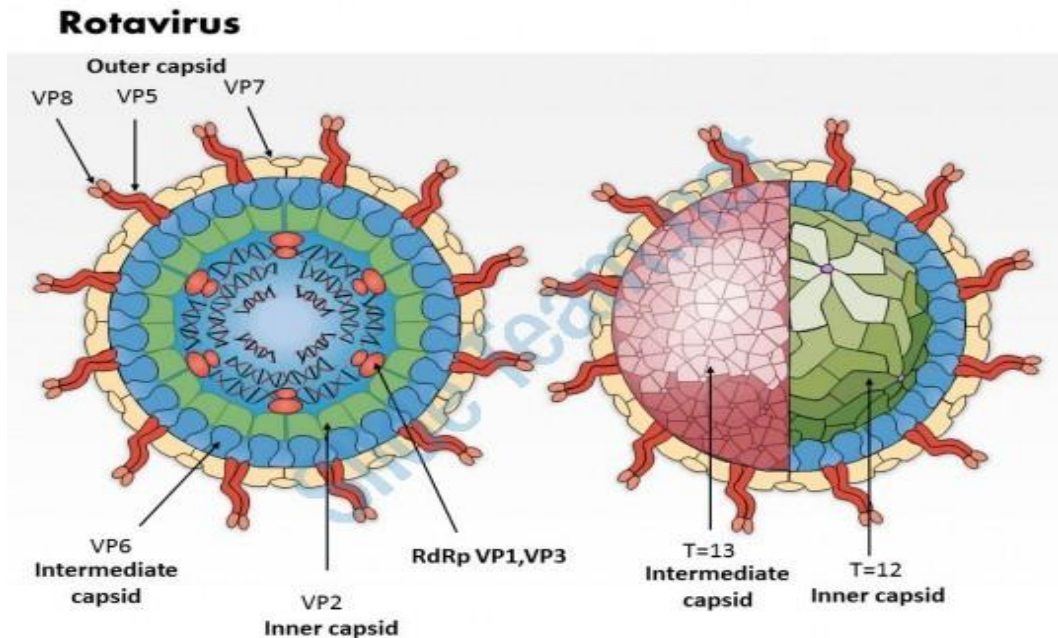
#### 1.4 Rotavírus

O gênero RV pertence à família *Reoviridae* e à subfamília *Sedoreovirinae*. O vírion tem aproximadamente 70-90 nm de diâmetro e é constituído por 11 segmentos genômicos de RNA fita dupla (RNAfd), envolto por três camadas proteicas concêntricas de simetria icosaédrica, que formam os capsídeos externo, intermediário e interno (ESTES; KAPIKIAN, 2013).

Cada segmento genômico do RV codifica uma proteína viral, sendo assim chamado de monocistrônico, exceto o segmento 11 que codifica duas proteínas, totalizando seis proteínas estruturais, denominadas VP (*viral protein*), e seis proteínas não estruturais, denominadas NSP (*non-structural protein*) (ESTES; KAPIKIAN, 2013).

Na camada interna do capsídeo, denominado de *core* ou núcleo viral, encontram-se as proteínas VP1, VP3 e VP2, sendo que as duas primeiras estão associadas ao genoma viral. A camada intermediária é composta pela proteína VP6 e a externa pelas proteínas VP4 e VP7. As proteínas não estruturais do RV são denominadas NSP (NSP1 a NSP6) (Figura 1) (PATTON, 1995; ESTES; KAPIKIAN, 2013).

**Figura 1.** Representação esquemática das estruturas do RV demonstrando as proteínas virais que compõem as camadas interna, intermediária e externa do capsídeo.



Fonte: [www.slideteam.net](http://www.slideteam.net)

A proteína mais abundante do vírion é a proteína estrutural VP6, que forma a camada intermediária do capsídeo. Os RV são classificados em oito espécies (A-H), de acordo com as características antigênicas e moleculares da proteína VP6 (MATTHIJNSSENS et al., 2012; ESTES; KAPIKIAN, 2013; ICTV, 2014). No entanto, recentemente Mihalov-Kovács e colaboradores (2015) propuseram uma nova espécie de RV (RVI) que foi detectado em cães. Das nove espécies de RV, apenas as espécies A, B, C e H determinam infecções que, por sua frequência, podem ser consideradas de importância epidemiológica para humanos e animais (ESTES; COHEN, 1989; ALFIERI et al., 1999b; RAHMAN et al., 2007; NAGASHIMA et al., 2008; MÉDICI et al., 2010; MOLINARI, et al., 2012). Os outros grupos de RV infectam apenas animais (PEDLEY et al., 1986; DEVITT; REYNOLDS, 1993).

## 1.5 Epidemiologia do rotavírus

A transmissão do RV pode ser de forma direta ou indireta, pela via fecal-oral, geralmente associada à ingestão de água ou alimentos contaminados pelo vírus (ESTES; KAPIKIAN, 2013). No entanto, há relatos da possibilidade de transmissão via aérea, sugerindo assim uma forma alternativa de transmissão (COOK et al., 1990).

Os RV possuem tropismo por enterócitos das porções apical e intermediária das vilosidades intestinais, presentes no intestino delgado, principalmente no terço final do jejuno e inicial do íleo, de animais jovens e crianças (LUNDGREN; SVENSSON, 2001; ZLOTOWSKI; DRIEMEIER; BARCELLOS, 2008). A diarreia é decorrente da má absorção devido à lise celular, diminuição das secreções de enzimas digestivas, por alteração funcional das junções celulares, além da produção da enterotoxina viral NSP4 que é característica dos RV (ZLOTOWSKI; DRIEMEIER; BARCELLOS, 2008; GREENBERG; ESTES, 2009).

Dentre os sinais clínicos da rotavirose a consistência das fezes variam de pastosa à líquida, com cor variável e que perdura em média por dois a cinco dias em média. Os animais podem apresentar anorexia, prostração e desidratação iniciando por volta do terceiro dia pós-infecção (PI), especialmente em leitões muito jovens, nos quais a infecção é mais grave. O RV pode ser excretado nas fezes por sete a oito dias após a infecção (THEIL et al., 1985; PAUL; STENVERSON, 1999; DEWEY et al., 2003).

Um ponto importante referente à epidemiologia dos RV é a evidência da possibilidade de *reassortment* (ressortimento), podendo ocorrer quando uma célula é co-infectada por dois ou mais RV, de modo que o vírion decorrente dessa infecção poderá ter segmentos genômicos originados dos dois vírus progenitores, formando uma nova combinação dos segmentos genômicos (ESTES; COHEN, 1989; GOMBOLD; RAMIG, 1994). O ressortimento pode facilitar a transmissão interespécies, além de aumentar a capacidade infecciosa do RV a partir da formação de novas cepas virais, evidenciando a variabilidade e complexidade desse vírus (TANIGUCHI; URASAWA, 1995; SANTOS et al., 1999).

## 1.6 Epidemiologia do rotavírus C

O rotavírus C (RVC) foi identificado na década de 80, nos Estados Unidos da América (EUA), em um leitão de 27 dias de idade apresentando diarreia (SAIF et al., 1980). Como à microscopia eletrônica o agente etiológico apresentava morfologia semelhante aos RV, foi inicialmente denominado como pararotavírus, rotavírus atípico, ou ainda rotavírus não grupo A (BRIDGER et al., 1987; SAIF et al., 1989).

Entre os anos 80 e 90 o RVC foi identificado como importante patógeno entérico em humanos (RODGER; BISHOP; HOLMES, 1982) e também em outras espécies animais, como bovinos (TSUNEMITSU et al., 1991), cães (OTTO et al., 1999) e furões (TORRES-MEDINA, 1987).

Em humanos, o RVC é a segunda espécie de RV mais frequente e está associado a casos esporádicos e surtos de gastroenterite em todo o mundo. O RVC, geralmente acomete crianças maiores de três anos de idade e adultos, ao contrário do rotavírus A (RVA), que acomete principalmente crianças menores de três anos de idade (ARISTA et al., 1990; JIANG et al., 1995; KUZUYA et al., 1998; ESONA et al., 2008).

Em suínos estudos sorológicos demonstraram alta prevalência de anticorpo (Ac) para RVC em rebanhos de todo o mundo (BROWN et al., 1987; BRIDGER, 1987; TERRET et al., 1987; SAIF, 1989). Soro de suínos de diferentes faixas etárias foram analisados e a soropositividade variou de 59 a 86% em leitões, aumentando com a idade, alcançando até 100% em suínos adultos (TERRET et al., 1987). Taxas de soropositividade de 93% e 97% foram encontradas em soro de suínos adultos no Japão e EUA, respectivamente (TSUNEMITSU; JIANG; SAIF, 1992).

No Brasil, com o intuito de identificar os principais agentes etiológicos envolvidos nos episódios de diarreia do pré e do pós-desmame dos leitões Fitzgerald e colaboradores (1988) realizaram um amplo estudo que avaliou a presença de cinco importantes enteropatógenos. O RV, tanto em infecções singulares quanto em infecções mistas, em associação principalmente com *Escherichia coli*, foi o agente etiológico mais frequentemente detectado. Brito e colaboradores (1995), avaliaram nos períodos de verão e inverno no Paraná, os agentes etiológicos causadores de diarreias em leitões lactentes, sendo que a infecção mista entre RV e *Escherichia coli* (31%) foi considerada a principal etiologia. Nesse mesmo estudo o RV foi

identificado em 31/68 (45,6%) amostras de fezes de leitões com diarreia e o RVC foi diagnosticado em 3% das 31 amostras positivas para RV.

Vários estudos conduzidos a partir da década de 90, em diferentes partes do mundo inclusive no Brasil, identificaram o *dsRNA* do RVC em amostras de fezes diarreicas de suínos com diferentes faixas etárias, sendo a ocorrência de forma singular ou em associação com outros enteropatógenos (Quadro 1) (ALFIERI et al., 1999a; KIM et al., 1999; MARTELLA et al., 2007<sup>a</sup>, 2007b; JEONG et al., 2009; MÉDICI et al., 2010, 2011; LEE et al., 2011; AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013; MARTHALER et al., 2013; LORENZETTI et al., 2014; STIPP et al., 2015; POSSATTI et al., 2016).

**Quadro 1.** Detecção do rotavírus C em amostras de fezes de suínos com ou sem diarreia em infecção mista ou singular, de acordo com o país de origem.

PAÍS	TÉCNICA	AMOSTRAS		REFERÊNCIAS
		TOTAL	POSITIVAS (%)	
Austrália	PAGE	237	7 (2,95)	Nagesha et al. (1981)
Canadá	PAGE	120	6 (5,0)	Magar, Robinson e Morin (1991)
África do Sul	PAGE	172	7 (4,1)	Geyer et al. (1996)
Tailândia	PAGE	557	2 (0,3)	Pongsuwanna et al. (1996)
Japão	PAGE	845	29 (3,4)	Sanekata et al. (1996)
EUA	PAGE	90	10 (11,1)	Janke et al. (1990)
	PAGE	1048	5 (0,5)	Will et al. (1994)
	RT-PCR	380	74 (19,5)	Amimo, Vlasova e Saif (2013)
Coréia do Sul	RT-PCR	137	36 (26,2)	Jeong et al. (2009)
		166	2 (1,2)	Lee et al. (2011)
EUA e Canadá	RT-PCR	7520	3447 (46,0)	Marthaler et al. (2013)
República Tcheca	RT-PCR	293	75 (25,6)	Mouteliková, Prodelalová e Dufková (2014)
Brasil	RT-PCR	34	17 (50,0)	Alfieri et al., (1999a)
	RT-PCR	144	33 (22,9)	Médici et al. (2011)
	PAGE e RT-PCR	33	31 (93,9)	Lorenzetti et al., (2014)

PAGE= eletroforese em gel de poliacrilamida; RT-PCR= Reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa

Collins, Martella e O'Shea, (2008) realizaram um estudo com leitões assintomáticos e observaram 4,4% (13/292) de prevalência do RVC, segundo os autores, estes casos podem estar associados à imunidade maternal ou à circulação de cepas naturalmente atenuadas. Apesar da diarreia causada pelo RVC ser mais frequente em leitões nas fases de maternidade e creche (LEE et al., 2011; MÉDICI et al., 2011; AMIMO, VLASOVA; SAIF, 2013; MARTHALER et al., 2013; MOUTELÍKOVÁ; PRODELALOVÁ; DUFKOVÁ, 2014) surtos de diarreia em suínos adultos relacionados ao RVC, com altas taxas de morbidade (60-80%) foram relatados em rebanhos de Michigan, EUA (KIM et al., 1999).

Morin, Magar e Robinson (1990) descreveram um surto de diarreia que iniciou logo após o nascimento dos leitões (24-48 horas) em uma granja no Canadá, onde identificaram o RVC como o único agente etiológico e foram observadas taxas de mortalidade de 5-10% e morbidade de 100%.

Os RV são considerados vírus espécie-específicos (ESTES; KAPIKIAN, 2013), no entanto, a ocorrência de infecções por RVC entre diferentes espécies animais, denominadas infecções heterólogas, tem sido relatada (COOK et al., 2004). A cepa de RVC *porcine-like* WD534-tc foi detectada em bovino (CHANG et al., 1999), e a cepa de RVC *bovine-like* 06-48-2 foi detectada em suíno (JEONG et al., 2009). Além disso, em um estudo epidemiológico longitudinal, uma cepa *porcine-like* foi detectada em crianças brasileiras, evidenciando o potencial zoonótico do RVC suíno (GABBAY et al., 2008)

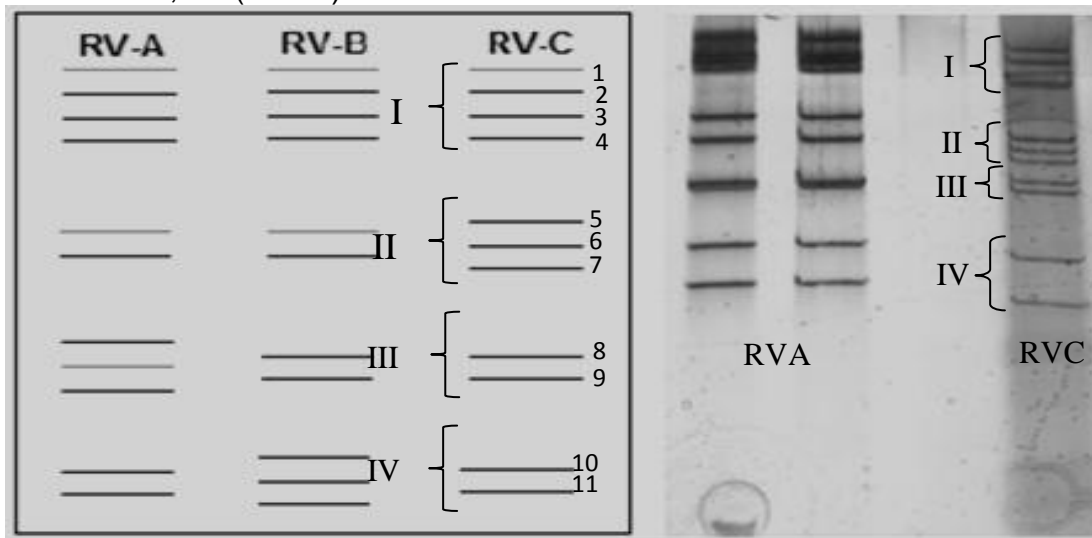
Marthaler e colaboradores (2013) detectaram RV suíno em 343/635 (54%) amostras de pulmões que apresentavam lesões histológicas de bronquiolite e alveolite, tais amostras, foram negativas nas pesquisas de patógenos frequentemente associados às doenças respiratórias em suínos (vírus da influenza A, vírus da síndrome respiratória e reprodutiva do suíno, circovírus suíno tipo 2, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *M. hyorhinis*, *M. synoviae* e *Haemophilus parasuis*). Nessas amostras, RVA foi mais frequente (50%), seguido pelo RVC (10%) e pelo rotavírus B (RVB) (5%). Esta foi a primeira detecção do RVC em tecido pulmonar, mas sem comprovação de viremia ou replicação deste vírus no pulmão. O RVA possui habilidade de causar viremia e a excreção do vírus pela via respiratória possivelmente está relacionada a essa situação (AZEVEDO et al., 2005; CRAWFORD et al., 2006).

## 1.7 Diagnóstico do Rotavírus

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (*PAGE - polyacrylamide gel electrophoresis*) seguida da impregnação com nitrato de prata, descrita por Pereira et al. (1983) e Herring et al. (1982), respectivamente, é uma das técnicas mais utilizadas para a detecção do *dsRNA* dos RVs na qual o perfil de migração dos segmentos genômicos permite a diferenciação dos RVs em eletroferogrupos distintos, correspondentes aos sorogrupos (RODGER et al., 1981; ESTES, GRAHAM; DIMITROV, 1984; MATTHIJNSSENS et al., 2012). O padrão genômico de migração característico do RVC consiste de classes ou regiões de diferentes massas moleculares contendo os segmentos de *dsRNA* de 1 a 4 (Classe I); 5, 6 e 7 (Classe II); 8 e 9 (Classe III) e segmentos 10 e 11 (Classe IV) (Figura 2). Esta disposição é frequentemente representada como 4-3-2-2, indicando o número de segmentos genômicos encontrados em cada classe (SAIF; JIANG, 1994; ALFIERI et al., 2012).

Com o avanço das técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase, precedida de transcrição reversa (RT-PCR) a partir dos anos 90, os problemas ocasionados por falhas na conservação das amostras fecais, foram minimizados, pois não exigem a viabilidade da partícula viral, uma vez que a análise é realizada por meio da amplificação de fragmentos genômicos. A eficiência da RT-PCR foi aprimorada pela adoção de métodos mais eficazes de extração do ácido nucleico viral e do uso de controles internos na reação da PCR, melhorando sua sensibilidade e especificidade (WINIARCZYK; GRADZKI, 1999; ELSCHNER et al., 2002). A partir daí a técnica de RT-PCR tornou-se um dos métodos mais utilizados na detecção dos RV de diferentes espécies, tanto a partir de amostras diarreicas quanto amostras controle provenientes de animais e humanos (WINIARCZYK; GRADZKI, 1999; ELSCHNER et al., 2002; GUAN et al., 2016; SOLTAN et al., 2016). O diagnóstico da rotavirose por meio da RT-PCR permite a identificação de cepas virais com espécies incomuns e a presença de infecções mistas em materiais biológicos variados (HEIDE et al., 2005). Os resultados da RT-PCR têm revelado a real estimativa da prevalência das infecções por RV, possibilitou definir os grupos de RV circulantes em uma população ou rebanho, e tem permitido avaliar a ocorrência, distribuição geográfica e sazonalidade da rotavirose no Brasil e no mundo (DESSELBERGER; ITURRIZA-GOMARA; GRAY, 2001; STIPP et al., 2014; LORENZETTI et al., 2014; SOLTAN et al., 2016).

**Figura 2** – Perfil de migração eletroforético dos segmentos genômicos dos rotavírus A, B e C. Representação esquemática (esquerda) e fotografia do gel de poliacrilamida 7,5% (direita).



### 1.8 Controle e profilaxia

O RV possui algumas características peculiares, tais como a resistência do vírion frente a condições ambientais adversas e aos produtos químicos como os desinfetantes, pode apresentar infecções subclínicas, além da transmissão interespecie, esses fatores fazem com que os episódios de diarreia causados pelo RV apresentem particularidades não observadas em infecções entéricas ocasionadas por bactérias, protozoários e/ou outros vírus. Frente a essas pontuações, a profilaxia das rotaviroses não pode ser restringida apenas na implementação de medidas higiênicas sanitárias, pois os RVs podem ser determinante em muitos surtos de diarreia com impacto na saúde pública e animal mesmo em países desenvolvidos e/ou em criações com manejo zootécnico e sanitário adequados (MARTELLA et al., 2007a; COLLINS et al., 2008; JEONG et al., 2009).

Quando o objetivo é reduzir o número e a intensidade dos episódios de diarreia, principalmente em animais neonatos, algumas medidas gerais de manejo podem ser implementadas, tais como: i) a limpeza rigorosa e desinfecção de instalações, utensílios e equipamentos; ii) intercalar princípio ativo do desinfetante; iii) a aplicação de dose de choque e dose de manutenção posterior do glutaraldeído; iv) “*all in - all out*” no setor de maternidade por pelo menos uma semana; v) manejo

do fluxo na maternidade sempre começando com as baias com leitões assintomáticos e só então ir para as baias com animais com diarreia; vi) intensificação das ações de assistência ao parto; vii) a imunização de todas as matrizes no período pré-parto contra a diarreia neonatal com vacinas polivalentes, incluindo *E. coli*, *Clostridium perfringens* e RVA.

A vacinação das matrizes no terço final da gestação, assim como outras medidas profiláticas, são condutas importantes a serem implantadas no desenvolvimento de um programa sanitário que inclui o controle e profilaxia da diarreia em leitões. Em leitões, devido à maior prevalência das diarreias ocasionadas pelo RVA, em relação às ocasionadas por outras espécies de RV (RVB e RVC principalmente), somente são disponíveis no mercado vacinas para o RVA. O sucesso da vacinação é amplamente observado e consolidado na saúde pública, visto que estas vacinas apresentam cerca de 70% de eficácia, sendo responsáveis por redução nas taxas de morbidade e mortalidade de crianças em países em desenvolvimento (MUNOS et al., 2010).

Considerando que: i) além do RVA, o RVC também contribui para a ocorrência de episódios de diarreia em leitões lactentes e recém-desmamados; ii) as infecções pelo RVC podem ocorrer tanto de forma singular quanto mista e principalmente em animais com até sete dias de idade); iii) a não disponibilidade de vacinas para o controle e profilaxia para o RVC; iv) o desconhecimento da epidemiologia da rotavirose suína ocasionadas pelo RVC; v) a alta frequência de ocorrência de diarreia em leitões lactentes em todo o Brasil e vi) o impacto sanitário das diarreias neonatais na suinocultura brasileira; o estudo da incidência do RVC, em episódios de diarreia em leitões lactentes é de crucial importância para elucidar tanto o impacto da infecção na produção de leitões quanto para definir os principais aspectos epidemiológicos da infecção.

## 1.9 Referências

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL – ABPA, disponível em: <<http://abpa-br.com.br>> Acesso em: 16 de novembro 2015 e 28 de janeiro de 2016.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BEUTTEMULLER, E.A.; BRITO, B.G.; MÉDICI, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do estado do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p.5-11, 1999a.

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 animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **Journal of Virological Methods**, v.83, p.35-43, 1999b.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BARRY, A, F. Diarreias em suínos. In: ALBERTON, G.C.; ZOTTI, E. (Org.). **Tópicos em sanidade e manejo de suínos**. Campinas: Sanphar; Sorocaba: Conciência Ecológica, 2010. p.165-206.

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; MATOS, A.C.D.; LORENZETTI, E.; LOBATO, Z.I.P. Reoviridae. In FLORES, E.F. (Org.). **Virologia Veterinária**. 2.ed., Santa Maria: Editora da UFSM, 2012. p.898-941.

ABRAHÃO, A.A.F.; VIANNA, W.L.; CARVALHO, L.F.O.S; MORETTI, A.S. Causas de mortalidade de leitões neonatos em sistema intensivo de produção de suínos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.41, p.86-91, 2004.

AIRES, J.F.; METZ, M.; BIRCK, L.J.; HERMANN, A.I.; OLIVEIRA, L. Causas de mortalidade de leitões até o desmame em granja comercial na região noroeste do Rio Grande do Sul. Salão do conhecimento, anais: **Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico Evento: XXII Seminário de Iniciação Científica**, Unijuí 2014.

AMIMO, J.O.; VLASOVA, A.N.; SAIF, L.J. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. **Veterinary Microbiology**, v.164, p.27-38, 2013.

ARISTA, S.; GIOVANNELLI, L.; PISTOIA, D.; CASCIO, A.; PAREA, M.; GERNA, G. Electropherotypes, subgroups and serotypes of human rotavirus strains causing gastroenteritis in infants and young children in Palermo, Italy, from 1985 to 1989. **Research in Virology**, v.141, p.435-448, 1990.

AZEVEDO, M.S.; YUAN, L.; JEONG, K.I.; GONZALEZ, A.; NGUYEN, T.V.; POULY, S.; GOCHNAUER, M.; ZHANG, W.; AZEVEDO, A.; SAIF, L.J. Viremia and nasal and rectal shedding of rotavirus in gnotobiotic pigs inoculated with Wa human rotavirus. **Journal of Virology**, v.79, p.5428-5436, 2005.

AZEVEDO, D.K.R.; SOUZA, N.R.; PAIVA, E.E.; GOMES, L.P.; ANDRADE, T.S.; PINHEIRO, A.C.; SANTOS, S.G.C.G.; CARNEIRO, W.P. Principais causas da mortalidade de leitões no período de pré-desmame. Anais: **XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Dimensões tecnológicas e sociais da zootecnia Fortaleza/Ceara/ Brasil – 27-29 maio 2015.

BRIDGER, J.C. Novel rotaviruses in animals and man. In: BOCK, G.; WHELAN, J. **Novel diarrhea viruses**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1987. p.6-23.

BRITO, B.G.; FILLIPSEN, L.F.; MORES, N.; BRENTANO, N.; BRITO, M.A.V.P. Etiologia da diarréia de leitões lactentes em granjas suínícolas do sudoeste do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v.16, p.13-17, 1995.

BROWN, D.W.G.; BEARDS, G.M.; GUANG-MU, C.; FLEWETT, T.H. Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in humans and animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.316-319, 1987.

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

CHANG, K.O.; NIELSEN, P.R.; WARD, L.A.; SAIF, L.J. Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. **Journal of Virology**, v.73, p.9284-9293, 1999.

COLLINS, P.J.; MARTELLA, M.; O'SHEA, H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2973-2979, 2008.

COOK, S.M.; GLASS, R.I.; LeBARON, C.W.; MEI-SHANG, H. Global seasonality of rotavirus infectious. **Bulletin of the World Health Organization**, v.68, p.171-177, 1990.

COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K.; GOMARA, M.I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infectious Diseases**, v.48, p.289-302, 2004.

CRAWFORD, S.E.; PATEL, D.G.; CHENG, E.; BERKOVA, Z.; HYSER, J.M.; CIARLET, M.; FINEGOLD, M.J.; CONNER, M.E.; ESTES, M.K. Rotavirus viremia and extra intestinal viral infection in the neonatal rat model. **Journal of Virology**, v.80, p.4820-4832, 2006.

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

DEVITT, C.M.; REYNOLDS, D.L. Characterization of a Group D Rotavirus. **Avian diseases**, v.37, p.749-755, 1993.

- DEWEY, C.; CARMAN, S.; PASMA, T.; JOSEPHSON, G.; McEWEN, B., Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. **Canadian Veterinary Journal**, v.44, p.649-653, 2003.
- ELSCHNER, M.; PRUDLO, J.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; SACHSE, K. Nested Reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of group A rotaviruses. **Journal Veterinary Medicine B**, v.49, p.77-81, 2002.
- ESONA, M.D.; HUMPHREY, C.D.; DENNEHY, P.H.; JIANG, B. Prevalence of group C rotavirus among children in Rhode Island, United States. **Journal of Clinical Virology**, v.42, p.221-224, 2008.
- ESTES, K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiological Review**, v.53, p.410-449, 1989.
- ESTES, M.K.; GRAHAM, D.Y.; DIMITROV, D.H. The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. **Progress in Medical Virology**, v.29, p.1-22, 1984.
- FITZGERALD, G.R.; BARKER, T.; WELTER, M.W.; WELTER, C.J. Diarrhea in young pigs: comparing the incidence of the five most common infectious agents. **Journal of Veterinary Medicine**, v.38, p.80-86, 1988.
- GABBAY, Y.B.; BORGES, A.A.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; BARARDI, R.M.; WANG, Y.; MASCARENHAS, J.D.P.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotaviruses among children in Belém, Brazil. **Journal of Medical Virology**, v.80, p.1666-1674, 2008.
- GEYER, A.; SEBATA, T.; PEENZE, I.; STEELE, A.D. Groups B and C porcine rotavirus identified for the first time in South African. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.67, n.3, p.115-116, 1996.
- GOMBOLD, J.L.; RAMIG, R.F. Genetics of the rotaviruses. **Current topics in microbiology and immunology**, v.185, p.129-177, 1994.
- GREENBERG, H.D.; ESTES, M.K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. **Gastroenterology**, v.136, p.1939-1951, 2009.
- GREGORI, F.; RUIZ, V.L.A.; BERSANO, J.G.; CENTOFANTI, T. Divulgação técnica: Rotavírus em criações de suínos. **Biológico**, v.66, n.1-2, p.11-12, 2004.
- GUAN, H.; ZHANG, J.; XIAO, Y.; SHA, D.; LING, X.; KAN, B. Evaluation of PCR Based assays for the improvement of proportion estimation of bacterial and viral pathogens in diarrheal surveillance. **Frontiers in Microbiology**, v.7, 386, 2016.
- HEIDE, R.V.; KOOPMANS, M.P.G.; SHEKARY, N.; HOUWERS, D.J.; VAN DUYNHOVEN, Y.T.H.P.; van der POEL, W.H.M. Molecular characterization of human and animal group A rotaviruses in the Netherlands. **Journal of Clinical Microbiology**, n.43, v.2, p.669-675, 2005.

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

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy: 2014 Release. Disponível em < <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp> >: Acesso em: 22 de janeiro 2016.

JANKE, B.H.; NELSON, J.K.; BENFIELD, D.A.; NELSON, E.A. Relative prevalence of typical and atypical strain among rotavirus from diarrheic pigs in conventional swine herds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.2, p.308-311, 1990.

JEONG, Y.; PARK, S.; HOSMILLO, M.; SHIN, D.; CHUN, Y.; KIM, H.; KWON, H.; KANG, S.; WOO, S.; PARK, S.; KIM, G.; KANG, M.; CHO, K. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. **Veterinary Microbiology**, v.138, p.217-224, 2009.

JIANG, B.M.; DENNEHY, P.H.; SPANGENBERGER, S.; GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I. First detection of group C rotavirus in fecal specimens of children with diarrhea in the United States. **Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.45-50, 1995.

JÚNIOR, J.G.C.; ARAÚJO, G.M.; VIEITES, F.M.; ABREU, J.G.; COCHOVE, V.C.; SILVA, G.S. Causas de mortalidade em leitões em granja comercial do médio-norte de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.17, n.1, 2010.

KATOULI, M.; LUND, A.; WALLGREN, P.; KUHN, I.; SODERLIND, O.; MOLLBY, R. Phenotypic characterization of intestinal Escherichia coli of pigs during suckling, postweaning and fattening periods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.2, p.778-783, 1995.

KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.18, p.350-354, 2006.

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

KUZUYA, M.; FUJII, R.; HAMANO, M.; YAMADA, M.; SHINOZAKI, K.; SASAGAWA, A.; HASEGAWA, S.; KAWAMOTO, H.; MATSUMOTO, K.; KAWAMOTO, A.; ITAGAKI, A.; FUNATSUMARU, S.; URASAWA, S. Survey of human group C rotaviruses in Japan during the winter of 1992 to 1993. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.6-10, 1998.

LEE, S.G.; YOUN, S.H.; OH, M.H.; RHEE, O.J.; OH, S.; PAIK, S.Y. Molecular characterization of two strains of porcine group C rotavirus. **Journal of Microbiology**, v.49, p.1058-1062, 2011.

- LINARES, R.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; FERONATO, C.; GRIEDER, W.; ALFIERI, A.A. Frequency of group A rotavirus in piglet stool samples from non-vaccinated Brazilian pig herds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.63-68, 2009.
- LORENZETTI, E.; STIPP, D.T; POSSATTI, F.; CAMPANHA, J.E.T.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.5, p.391-397, 2014.
- LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes and Infection**, v.3, p.1145-1156, 2001.
- MARTELLA, V.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A.L.; DECARO, N.; CAMERO, M.; BOZZO, G.; MOSCHIDOU, P.; ARISTA, S.; PEZZOTII, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of group C rotavirus in weaning and post-weaning pigs with enteritis. **Veterinary Microbiology**, v.123, p.26-33, 2007a.
- MARTELLA, V.; BANYAI, K.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; BELLACICCO, A.L.; DESARIO, C.; CORRENTE, M.; GRECO, G.; MOSCHIDOU, P.; TEMPESTA, M.; ARISTA, S.; CIARLET, M.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Genetic heterogeneity in the VP7 of group C rotaviruses. **Virology**, v.367, p.358-366, 2007b.
- MAGAR, R.; ROBISON, Y.; MORIN, M. Identification of atypical rotaviruses in outbreaks of preweaning and postweaning diarrhea in Quebec swine herds. **Canadian Journal Veterinary Research**, v.55, p.260-263, 1991.
- MARTHALER, D.; ROSSOW, K.; CULHANE, M.; COLLINS, J.; GOYAL, S.; CIARLET, M.; MATTHIJNSSENS, J. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. **Virology**, v.446, p.189-198, 2013.
- MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v.157, n.6, p.1177-1182, 2012.
- MÉDICI, K.C.; BARRY, A.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. VP6 gene diversity in Brazilian strains of porcine group C rotavirus. **Genetics and Molecular Research**, v.9, p.506-513, 2010.
- MÉDICI, K.C.; BARRY, A.; ALFIERI, F.A.; ALFIERI, A.A. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Swine Health and Production**, v.19, p.146-150, 2011.
- MELIN, L.; KATOULI, M.; LINDBERG, A.; FOSSUM, C.; WALLGREN, P. Weaning of piglets effects of an exposure to a pathogenic strain of *Escherichia coli*. **Journal Veterinary Medicine B**, v.47, p.663-675, 2000.

MIHALOV-KOVÁCS, E.; GELLÉRT, A.; MARTON, S.; FARKAS, S.L.; FEHÉR, E.; OLDAL, M.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, v.21, n.4, p.660-663, 2015.

MOUTELIKOVÁ, R.; PRODELALOVÁ, J.; DUFKOVA, L. Prevalence study and phylogenetic analysis of group C porcine rotavirus in the Czech Republic revealed a high level of VP6 gene heterogeneity within porcine cluster I. **Archives of Virology**, v.159, p.1163-1167, 2014.

MOLINARI, B.L.D.; LORENZETTI, E.; OTONEL, R.A.A; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n.6, 1019-1022

MORIN, M.; MAGAR R.; ROBINSON Y. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.54, p.385-389, 1990.

MUNOS, M.K.; WALKER, C.L.F.; BLACK, R.E. The effect of rotavirus vaccine on diarrhoea mortality. **International Journal of Epidemiology**, v.39, p.56-62, 2010.

NAGASHIMA, S.; KOBAYASHI, N.; ISHINO, M.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; PAUL, S.K.; GANESH, B.; CHAWLA-SARKAR, M.; KRISHNAN, T.; NAIK, T.N.; WANG, Y.H. Whole genomic characterization of a human rotavirus strain B219 belonging to a novel group of the genus rotavirus. **Journal of Medical Virology**, v.80, p.2023-2033, 2008.

NAGESHA, H.S.; HUN, C.P.; BRIDGER, J.C.; HOLMES, I.H. Atypical rotavirus in Australian pigs. **Archives of Virology**, v.102, p.91-98, 1981.

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

PATTON, J.T. Structure and function of the rotavirus RNA-binding proteins. **Journal of General Virology**, v.76, p.2633-2644, 1995.

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

PAUL, P.S; STEVENSON, G.W. Rotavirus end Reovirus. In. STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. **Disease of Swine**, 8<sup>th</sup> ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1999. p.255-277.

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

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 Pará, Brazil **The Journal of Hygiene**, 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.5, p.1050-1057, 1996.

POSSATTI, F.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Genetic heterogeneity of the VP6 gene and predominance of G6P[5] genotypes of Brazilian porcine rotavirus C field strains. **Archives of Virology**, v.161, p.1061-1067, 2016.

RAHMAN, M.; HASSAN, Z.M.; ZAFRUL, H.; SAIADA, F.; BANIK, S.; FARUQUE, A.S.G.; DELBEKE, T.; MATTHIJNSSENS, J.; VAN RANST, M.; AZIM, T. Sequence analysis and evolution of group B rotaviruses. **Virus Research**, v.125, p.219-225, 2007.

RODGER, S.M.; BISHOP, R.F.; HOLMES, I.H. Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, p.724-726, 1982.

RODGER, S.M.; BISHOP, R.F.; BIRCH, C.; McLEAN, B.; HOLMES, I.H. Molecular epidemiology of human rotaviruses in Melbourne, Australia, from 1973 to 1979, as determined by electrophoresis of genome ribonucleic acid. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, p.272-278, 1981.

SAIF, L.J.; BOHL, E.H.; THEIL, K.W.; CROSS, R.F.; HOUSE, J.A. Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.12, p.105-111, 1980.

SAIF, L.J. Non group A rotaviruses. In: SAIF, L.J.; THEIL, K.W. (Org.). **Viral diarrheas of man and animals**. Florida: CRC Press, 1989. p.73-96.

SAIF, L.J.; JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. **Current Topics Microbiological Immunology**, v.185, p.339-371, 1994.

SANEKATA, T.; KUWAMOTO, Y.; AKAMATSU, S.; SAKON, N.; OSETO, M.; TANIGUCHI, K.; NAKATA, S.; ESTES, M.K. Isolation of group B porcine rotavirus in cell culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.3, p.759-761, 1996.

SANTOS, N.; LIMA, R.C.C.; NOZAWA, C.M.; LINHARES, R.E.; GOUVEA, V. Detection of porcine rotavirus type G9 and of a mixture of types G1 and G5 associated with Wa-like VP4 specificity: evidence for natural human-porcine genetic reassortment. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2734-2736, 1999.

SILVA, C.A.; BRITO, B.G.; MORES, N.; AMARAL, A.L. Fatores de risco relacionados com o desempenho de leitões lactentes em granjas de suínos da região norte do Paraná. **Ciência Rural**, v.28, n.4, p.677-681, 1998.

- SOLTAN, M.A.; TSAI, Y.; LEE, P.A.; TSAI, C.; CHANG, H.G.; WANG, H.T.; WILKES, R.P. Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. **Journal of Virological Methods**, v. 235, p. 99-104 2016
- SPENCER, B.T.; HOWELL, P.G.; HILLMAN, K.; MURDOCH, T.A.; SPENCER, R.J.; STEWARD, C.S. Some husbandry factors influencing weaning stress in piglets. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.60, p.62-64, 1989.
- STIPP, D.T.; ALFIERI, A.F.; LORENZETTI, E.; DA SILVA MEDEIROS, T.N.; POSSATTI, F.; ALFIERI, A.A. VP6 gene diversity in 11 Brazilian strains of porcine group C rotavirus. **Virus Genes**, v.50, n.1, p.142-146, 2015.
- TAGLIARI, K.C.; BRITO, B.G. Redução do ganho de peso e ocorrência de mortalidade por diarreia em leitões lactentes. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v.4, n.2, p.211-213, 1998.
- TANIGUCHI, K.; URASAWA, S. Diversity in rotavirus genomes. **Virology**, v.6, p.123-131, 1995.
- TERRETT, L.A.; SAIF, L.A.; THEIL, K.W.; KOHLER, E.M. Physicochemical characterization of porcine pararotavirus and detection of virus and viral antibodies using cell culture immunofluorescence. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, p.268-272, 1987.
- THEIL, K.W.; SAIF, L.J.; MOORHEAD, P.D.; WHITMOYER, R.E. Porcine rotavirus like virus (group B rotavirus): characterization and pathogenicity for gnotobiotic pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.21, p.340-345, 1985.
- TORRES-MEDINA, A. Isolation of an atypical rotavirus causing diarrhea in neonatal ferrets. **The Journal of American Association of Laboratory Animal Science**, v.37, p.167-171, 1987.
- TSUNEMITSU, H.; SAIF, L.J.; JIANG, B.M.; SHIMIZU, M.; HIRO, M.; YAMAGUCHI, H.; ISHIYAMA, T.; HIRAI, T. Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.2609-2613, 1991.
- TSUNEMITSU, H.; JIANG, B.M.; SAIF, L.J. Detection of group C rotavirus antigens and antibodies in animals and humans by enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2129-2134, 1992.
- ZLOTOWSKI, P.; DRIEMEIER, D.; BARCELLOS, D.E.S.N. Patogenia das diarreias dos suínos: modelos e exemplos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, Supl 1, s81-s86, 2008.
- WINIARCZYK, S.; GRADZKI, Z. Comparison of polymerase chain reaction and dot hybridization with enzyme-linked immunoassay, virological examination and polyacrylamide gel electrophoresis for the detection of porcine Rotavirus in faeces specimens. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.46, p.623-634, 1999.

WILL, L.A.; PAAUL, P.S.; PROESCHLDT, T.A.; AKTAR, S.N.; FLAMING, K.P.;  
JANKE, B.H.; SACKS, J.; LYOO, Y.S.; HILL, H.T.; HOFFMAN, L.J.; WU, L.L.  
Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an  
epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases.  
**Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.6, p.416-422, 1994.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliação longitudinal da infecção pelo rotavírus C (RVC) em leitões neonatos (com até sete dias de idade) com diarreia, provenientes de uma granja do estado do Paraná.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o RVC utilizando a técnica de RT-PCR, em amostras de fezes de leitões com até uma semana de idade;
- Avaliar se há influencia do escore de diarreia, da ordem de parto, do tamanho da leitegada e do peso ao nascer dos leitões na incidência de RVC.



### 3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

#### ***A longitudinal study of rotavirus C infection in litters with piglets up to 1-week-old***

##### **Abstract**

The neonatal diarrhea is a major sanitary problem in the Piglet Production Units. Porcine rotavirus (RVA) is considered the most frequently RV detected in piglets diarrhea outbreaks worldwide. However, the reports of rotavirus C (RVC) involved in diarrhea outbreaks in piglets showing the importance of that species in the development of rotavirus in very young piglets have been increased in the last years. Therefore, the objective of this study was to evaluate the incidence of infection in neonates RVC piglets up to seven days old, for five weeks. For this study, 534 piglets from 50 litters were monitored daily for the occurrence of diarrhea. A total of 206 diarrheic fecal samples were collected and classified according their score. Ten fecal samples with normal consistency were randomly collected from asymptomatic piglets from the same litters and used as negative controls. Some production parameters for the litters or piglets were also evaluated in this study. All litters were classified according the number of parities of sows in five categories of sow parity (SP 1 to 5). Regarding the size, the litters were further divided into two groups (Litter Size - LS) including litter having up to 10 piglets ( $LS \leq 10$ ) and litter having more than 10 piglets ( $LS > 10$ ). According to the birth weight (BW) the piglets were classified in BW1 (1.2 to 1.3 Kg) and BW2 ( $> 1.3$  to 1.4 Kg). All fecal samples were screened for dsRNA of RV by a silver stained-polyacrylamide gel electrophoresis (ss-PAGE), and samples with both inconclusive and negative results were submitted to partial RVC VP6 gene amplification. Statistical analysis was performed using chi-square test ( $\chi^2$ ). Of the 534 piglets monitored 206 (38.6%) had diarrhea, these 71/206 (34.5%) were positive for RVC. The incidence of RVC was 71/534 (13.3%). In the control group ( $n=10$ ) only 1 (10%) sample was positive. According the fecal consistency the highest frequency detection of RVC occurred in the liquid fecal samples (42.2%). When the results of RVC dsRNA detection were distributed by the litters evaluated in this study, 33/50 (66%) litters have positive fecal samples. According to the order of sow parity, the frequency of RVC detection varied from 33.3% to 87.5%; the litter size group  $LS > 10$  and the birth weight group 2 ( $> 1.3$  to 1.4 Kg) showed higher frequency (73.5% and 71.0%, respectively) of RVC detection when compared with other evaluated groups. However, in any of the evaluated parameters (SP1 to 5; LS1 and 2; and BW1 and 2) was observed significant difference between groups. Nevertheless, the detection of RVC in diarrheic fecal samples throughout all period evaluated increases viral load in the environment contributing to the spread of the virus to other litters and other age groups present in the herd. In addition, this is the first longitudinal study regarding epidemiological aspects of RVC infection in newborn piglets up to seven days old.

**Key words:** Piglets. Birth order. Incidence. RVC

## 1. Introduction

The neonatal diarrhea is a major sanitary problem in the Piglet Production Units which leads to substantial economic losses for all the pork production chain. Despite enteric infections can occur throughout the nursing period, when the diarrhea episodes affects animals that are very young, up to one-week-old, they are more troubling, due the severe dehydration (FU; HAMPSON; BLACKMORE, 1989; TUBBS et al., 1993). Diarrhea is a syndrome triggered by several factors such as host immunity, management procedures, and different microorganisms. In the infection process may be involved bacteria, virus, and protozoa. Regarding the viruses, the rotavirus (RV) are distinguished by causing diarrhea in suckling and recently-weaned piglets (WITTUM et al., 1995; WIELER et al., 2001).

Rotavirus A (RVA) diarrhea outbreaks in piglets during the first week of life have been described throughout the world, and its frequency are higher than episodes of diarrhea caused by other RV species (MÉDICI et al., 2011; ESTES; GREENBERG, 2013; MARTHALER et al., 2014). However, recently, the reports of rotavirus C (RVC) involvement in enteric infection outbreaks, in newborn piglets, have increased in pig herds from several countries, including Brazil (JEONG et al., 2009; AMIMO; VLASOVA; SAIF, 2013; POSSATTI et al., 2016). Due the high morbidity rates and very young age of piglets, often these outbreaks enhance the mortality rates in this period of life (LORENZETTI et al., 2014).

The serologic diagnostic tests for RV identification, such as ELISA assay are specific to RVA VP6 gene. Due to the difficulty of replication and isolation of RVC in cell culture, there are no rapid diagnostic tests in the market for detection of this species of RV (SAIF, 1989). This deficiency is the main difficulty in this infection diagnosis, which lead the RVC presence in diarrhea cases/episodes not be identified or to be sub notified (MÉDICI et al., 2011).

Most reports of diarrhea outbreaks in newborn piglets up to 7-days-old, available in the literature describe transversal studies, with retrospective or descriptive features (JEONG et al., 2009; LORENZETTI et al., 2014; JEONG et al., 2015). Considering the increased frequency of RVC diarrhea outbreaks reports in very young piglets, this study aimed to evaluate over 37 days the frequency of RVC infection in piglets from a herd with previous diagnosis of RVC circulation in this age group.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Herd and sampling**

The piglet fecal samples included in this study were collected between July to August 2012, in a complete-cycle pig farm located in Guarapuava city, in the Central-Southern region of Paraná State. The pig herd consists of 4 different sites. The site 1 houses the boars, pregnant sows, and gilts. One week before the parturition, the pregnant sows are transferred to site 2, where they stay until their litters complete 3 weeks. The post-weaned piglets are housed in the site 3 up to 9 weeks old and in site 4 the growing-finishing pigs until slaughter. The farm adopted good nutritional and sanitary practices, including “all-in all-out” management.

For this study, during five weeks 534 piglets up to 7 days old from 50 litters were monitored daily for the occurrence of diarrhea. According the fecal consistency a diarrhea score was attributed at each sample. In total 206 diarrheic fecal samples of which 74 samples were classified as pasty (+), 61 semi-liquid (++) and 71 as liquid (+++) were collected. Additionally, 10 fecal samples with normal consistency were randomly collected from asymptomatic piglets from the same litters and used as negative controls

Some parameters for the litters or piglets were also evaluated in this study. All litters were classified according the number of parities of sows in five categories of sow parity (SP 1 to 5). Regarding the size the litters were further divided into two groups (Litter Size - LS) including litter having up to 10 piglets ( $LS \leq 10$ ) and litter having more than 10 piglets ( $LS > 10$ ). According to the birth weight (BW) the piglets were classified in BW1 (1.2 to 1.3 Kg) and BW2 ( $> 1.3$  to 1.4 Kg).

### **2.2. Nucleic acid extraction**

The nucleic acid extraction was performed from aliquots of 500  $\mu$ L of fecal suspension prepared at 10-20% (w/v) in Tris/ $Ca^{++}$  buffer (50 mM Tris-HCl; 10 mM NaCl; 1,5 mM 2-mercaptoetanol; 3 mM  $CaCl_2$ ; pH 7.2), using the combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) and silica/guanidinium isothiocyanate (BOOM et al., 1990) nucleic acid extraction methods with modifications, as described by Alfieri et al. (2006). The dsRNA was eluted in diethyl pyrocarbonate (DEPC) treated water (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA) and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Aliquots of  $\text{Tris}/\text{Ca}^{++}$  buffer were included as negative control in each extraction and RT-PCR procedures.

### **2.3. ss-PAGE**

All the 216 fecal samples were screened for dsRNA of RV by a silver stained-polyacrylamide gel electrophoresis (ss-PAGE) technique as described previously (HERRING et al., 1982; PEREIRA et al., 1983).

### **2.4. RT-PCR assay**

Both PAGE-negative and -inconclusive samples ( $n=170$ ) were submitted to specific RVC partial VP6 gene RT-PCR amplification, which was performed using the primer pair described by Alfieri et al. (1999). The products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel in TBE buffer (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA; pH 8.4), stained with ethidium bromide (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and visualized under UV light.

### **2.5. Statistical analysis**

The PAGE- and RT-PCR-positive samples were grouped in their litters. When the litter has one or more RVC positive fecal sample, it was considered as positive-litter. Statistical analysis was performed using chi-square ( $\chi^2$ ) test, with confidence limits of 95%. Results were considered statistically significant when two-tailed p-values were  $\leq 0.05$ .

## **3. Results**

Out of the 534 piglets evaluated 206 (38.6%) had diarrhea. Out of the 206 piglet diarrheic fecal samples analyzed by the ss-PAGE technique, 45 (21.8%) were RVC positive; 2 (0.97%) were RVA positive; 130 (63.1%) were RV negative; and 31 (15.0%) were inconclusive. Out of the 161 ss-PAGE-negative and -inconclusive results samples, 27 (12.5%) were positive in the partial RVC VP6 gene amplification. Thus RVC incidence was 72/534 (13.5%) and 33.3% (72/216) of diarrheic samples evaluated in this study were positive for RVC.

According the fecal consistency the highest frequency detection of RVC occurred in the liquid fecal samples (42.2%) (table 1).

**Table 1.** Fecal samples of piglets up to 1week old positive for porcine rotavirus C distributed according fecal consistency.

Fecal consistency	Samples evaluated (n=216)	
	Positive (%)	Total
(0) Normal	1 (10.0)	10
(+) Pasty	20 (27.0)	74
(++) Semi-liquid	21 (34.4)	61
(+++ ) Liquid	30 (42.2)	71
	72 (33.3)	216

P = 0,0958

When the results of RVC dsRNA detection were distributed by the litters evaluated in this study, 33 (66%) litters have positive fecal samples and were considered positive for RVC infection. Thereafter, the others characteristics concerning the litters were analyzed.

**Table 2.** Distribution of positive and negative litters up to 7-days-old for porcine rotavirus C infection according some parameters such as order of sow parity, litter size, and birth weight.

Parameter	Groups	Litters (n=50)	
		Positive (%)	Total
<b>Sow parity (SP)</b> P = 0,3060	SP1	12 (70.6)	17
	SP2	6 (66.6)	9
	SP3	6 (60.0)	10
	SP4	7 (87.5)	8
	SP5	2 (33.3)	6
<b>Litter size (LS)</b> P = 0,1013	LS ≤10	8 (50.0)	16
	LS >10	25 (73.5)	34
<b>Birth weight (BW)</b> P = 0,3435	BW 1.2 to 1.3 Kg	11 (57.9)	19
	BW >1.3 to 1.4Kg	22 (71.0)	31

According to the order of sow parity, the frequency of RVC detection varied from 33.3% to 87.5%; the litter size group LS>10 and the birth weight group 2

showed higher frequency (73.5% and 71.0%, respectively) of RVC detection when compared with other evaluated groups. However, in any of the evaluated production parameters (SP1 to 5; LS1 and 2; and BW1 and 2) was observed significant difference between groups (table 2).

#### 4. Discussion

Porcine RVC has been considered an important cause of enteritis in suckling and weaned piglets around the world (MARTELLA et al., 2007; JEONG et al., 2009; MARTHALER et al., 2013; POSSATTI et al., 2016). In this study, 33.3% of the diarrheic fecal samples evaluated from piglets up to one-week-old were positive for RVC. This is considered a crucial piglet lifetime due the higher occurrence of diarrhea and consequently, reduced daily weight gain and increasing the mortality rates (TUBBS et al., 1993). Several studies also demonstrated that RVC infection in Brazilian pig herds occurs primarily in suckling piglets (MÉDICI et al., 2010; MÉDICI et al., 2011; LORENZETTI et al., 2014; STIPP et al., 2015; POSSATTI et al., 2016).

Although the RVC dsRNA has been detected in asymptomatic pigs (COLLINS; MARTELLA; O'SHEA, 2008; MOUTELÍKOVÁ; PRODĚLALOVÁ; DUFKOVÁ, 2013), the virus was more frequently detected in pigs with diarrhea (MARTELLA et al., 2007; LORENZETTI et al., 2014; POSSATTI et al., 2016). Therefore, the score of diarrhea may interfere in the frequency of detection of RV, as demonstrated by Alfieri et al. (1991). In our study, besides the frequency of detection of RVC increased with decreasing of feces consistency, there is no difference between the scores of diarrhea analyzed. With regard to the fecal samples of normal consistency evaluated as control, only one sample was RVC positive by RT-PCR assay. This positive control sample was collected in a litter that was subsequently considered RVC positive once others RVC dsRNA positive diarrheic fecal samples were identified in the same litter.

Due the epitheliochorial nature of the sow placenta, the piglet born dependent of the passive immune transferred by sow via colostrum (ROOKE; BLAND, 2002). Several studies demonstrated that the health condition and performance of progeny improve with the increased parity of the sows (KLOBASA et al., 1986; CARNEY-HINKLE et al., 2013). Therefore, the transfer of maternal antibodies by colostrum intake is crucial for piglet protection against RV infection in the first one or two weeks old (FU; HAMPSON; WILKS, 1990). In this study, except for the SP4, which showed

the higher percentage of RVC, the frequency of RVC detection decreased with the increasing in SP, however no significant difference between the groups evaluated were found.

The RVC detection was more frequent in the  $LS > 10$  than in the  $LS \leq 10$ , however group without significant difference between both groups. A previous study confirmed that LS, besides increased the variability in mean birth weight, did not demonstrate significant effect in acquisition of passive immunity (KLOBASA et al., 2004), suggesting that in our study the piglets from bigger litters received passive immunization similar to the smaller litters.

Several studies demonstrated that the birth weight less than 1 kg affect the growth and survival of pigs, since the smaller piglets had disadvantaged when competing for teats with its littermates, which leads to poor acquisition of passive immunity (QUINIOU; DAGORN; GAUDRÉ, 2002; ROOKE; BLAND, 2002; CABRERA et al., 2012) and consequently more susceptibility a other infections. In the present study, the two birth weight groups evaluated did not exhibit significant difference between them, probably because there are no animals less than 1.2 Kg included in this study.

Although the groups did not significantly differ for anyone of analyzed features, the occurrence of RVC in the piglet first week may predispose at secondary infections and interfere in the animal performance until slaughter. Since the neonatal diarrhea depends on many factors, good management practices should be adopted to improve the productivity (WITTUM et al., 1995).

Differently from neonatal diarrhea caused by RVA, which have available vaccines for control and prophylaxis in national market, for the infections caused by RVC this measure is not available. Thereby, in neonatal diarrhea outbreaks caused by non-A RV species, even RVC, is required strengthen and monitor traditional measures of health management in general.

In the farm of this study, with goal of reduces the number and intensity of diarrhea episodes in the first week some general management measures were implemented such as: i) rigorous cleaning and disinfection of facilities, utensils, and equipments; ii) exchanged of the active disinfectant principle that was already being used for more than one year; iii) application of shock dose and subsequent maintenance dose of glutaraldehyde; iv) “all in – all out” management in the maternity stalls by at least one week; v) change in management flow of maternity always

starting with the stalls with asymptomatic piglets and only then go to the stalls with diarrheic animals vi) intensification of farrowing assistance actions; vii) immunization of all sows in the prepartum period against neonatal diarrhea with multivalent vaccines, including *E. coli*, *Clostridium perfringens* and RVA. These measures allow decreasing the number of episodes of diarrhea in the first week, and even the intensity of episodes, reducing the mortality rate.

The significance of the RVC involvement in the diarrhea episodes observed in this study is highlighted when we found that of the 206 diarrheic fecal samples evaluated by ss-PAGE only two were positive for RVA. Already, the electropherotypes RVB and RVH was not identified in the samples included in this study (data not show).

The detection of RVC in diarrheic fecal samples throughout all period evaluated increases viral load in the environment contributing to the spread of the virus to other litters and other age groups present in the herd. To the best of our knowledge, the studies conducted concerning RVC, until this moment, were transversal both in Brazil (MÉDICI et al., 2010; LORENZETTI et al., 2014; STIPP et al., 2015; POSSATTI et al., 2016) as in other countries (MARTELLA et al., 2007; MARTHALER et al., 2013; SUZUKI et al., 2014). Therefore, this is the first longitudinal study regarding epidemiological aspects of RVC infection first week old, since the litters which born each week in the same pig herd were monitored during a period of 5 weeks.

The results of this study highlight the importance of RVC in the etiology of porcine neonatal diarrhea in pigs particularly in newly-born piglets. As there are no vaccines available on the veterinary market that include RVC in your composition the special attention should be given to the control and prevention measures in order to reduce the viral load in the environment and therefore the challenge for newly-born piglets.

## 5. References

ALFIERI, A.A.; RESENDE, M.; CONTE, L.E.; ALFIERI, A.F. Evidences of the involvement of rotavirus in the diarrhea in weaning and post weaning pigs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 4, p. 291-300, 1991.

ALFIERI, A.A.; LEITE, J.P.; ALFIERI, A.F.; JIANG, B.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription-polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **Journal of Virological Methods**, v. 83, n. 1-2, p. 35-43, 1999.

ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, n. 7-8, p. 521-6, 2006.

AMIMO, J.O.; VLASOVA, A.N.; SAIF, L.J. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. **Veterinary Microbiology**, v. 164, n. 1-2, p. 27-38, 2013.

BOOM, R.; SOL, C.J.; SALIMANS, M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

CABRERA, R.A.; LIN, X.; CAMPBELL, J.M.; MOESER, A.J.; ODLE, J. Influence of birth order, birth weight, colostrum and serum immunoglobulin G on neonatal piglet survival. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 42, 2012.

CARNEY-HINKLE, E.E.; TRAN, H.; BUNDY, J.W.; MORENO, R.; MILLER, P.S.; BURKEY, T.E. Effect of dam parity on litter performance, transfer of passive immunity, and progeny microbial ecology. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 6, p. 2885-93, 2013.

COLLINS, P.J.; MARTELLA, V.; O'SHEA, H. Detection and characterization of group C rotaviruses in asymptomatic piglets in Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 9, p. 2973-9, 2008.

ESTES, M.K.; GREENBERG, H.B. Rotaviruses. In: **Fields Virology**, D.M. Knipe and P.M. Howley, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v. 2, p. 1347-1401, 2013.

FU, Z.F.; HAMPSON, D.J.; BLACKMORE, D.K. Detection and survival of group A rotavirus in a piggery. **The Veterinary Record**, v. 125, n. 23, p. 576-8, 1989.

FU, Z.F.; HAMPSON, D.J.; WILKS, C.R. Transfer of maternal antibody against group A rotavirus from sows to piglets and serological responses following natural infection. **Research in Veterinary Science**, v. 48, n. 3, p. 365-73, 1990.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-7, 1982.

JEONG, Y.J.; PARK, S.I.; HOSMILLO, M.; SHIN, D.J.; CHUN, Y.H.; KIM, H.J.; KWON, H.J.; KANG, S.Y.; WOO, S.K.; PARK, S.J.; KIM, G.Y.; KANG, M.I.; CHO, K.O. Detection and molecular characterization of porcine group C rotaviruses in South Korea. **Veterinary Microbiology**, v. 138, n. 3-4, p. 217-24, 2009.

JEONG, Y.J.; MATTHIJNSSENS, J.; KIM, D.S.; KIM, J.Y.; ALFAJARO, M.M.; PARK, J.G.; HOSMILLO, M.; SON, K.Y.; SOLIMAN, M.; BAEK, Y.B.; KWON, J.; CHOI, J.S.; KANG, M.I.; CHO, K.O. Genetic diversity of the VP7, VP4 and VP6 genes of Korean porcine group C rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 176, n. 1-2, p. 61-9, 2015.

KLOBASA, F.; BUTLER, J.E.; WERHAHN, E.; HABE, F. Maternal-neonatal immunoregulation in swine. II. Influence of multiparity on de novo immunoglobulin synthesis by piglets. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 11, n. 2, p. 149-59, 1986.

KLOBASA, F.; SCHRODER, C.; STROOT, C.; HENNING, M. Passive immunization in neonatal piglets in natural rearing-effects of birth order, birth weight, litter size and parity. **Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift Journal**, v. 117, n. 1-2, p. 19-23, 2004.

LORENZETTI, E.; STIPP, D.T.; POSSATTI, F.; CAMPANHA, J.E.T.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 391-397, 2014.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A.L.; DECARO, N.; CAMERO, M.; BOZZO, G.; MOSCHIDOU, P.; ARISTA, S.; PEZZOTTI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 1-3, p. 26-33, 2007.

MARTHALER, D.; ROSSOW, K.; CULHANE, M.; COLLINS, J.; GOYAL, S.; CIARLET, M.; MATTHIJNSSENS, J. Identification, phylogenetic analysis and classification of porcine group C rotavirus VP7 sequences from the United States and Canada. **Virology**, v. 446, n. 1-2, p. 189-98, 2013.

MARTHALER, D.; HOMWONG, N.; ROSSOW, K.; CULHANE, M.; GOYAL, S.; COLLINS, J.; MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. **Journal of Virological Methods**, v. 209C, p. 30-34, 2014.

MÉDICI, K.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. VP6 gene diversity in Brazilian strains of porcine group C rotavirus. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 506-13, 2010.

MÉDICI, K.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Swine Health and Production**, v. 19, n. 3, p. 146-150, 2011.

MOUTELÍKOVÁ, R.; PRODĚLALOVÁ, J.; DUFKOVÁ, L. Prevalence study and phylogenetic analysis of group C porcine rotavirus in the Czech Republic revealed a

high level of VP6 gene heterogeneity within porcine cluster I1. **Archives of Virology**, v. 159, p. 1163-1167, 2013.

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.; CANDEIAS, J.A.; RACZ, M.L.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; TRABULSI, J.R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, Sao Paulo and Para, Brazil. **The Journal of Hygiene**, v. 90, n. 1, p. 117-25, 1983.

POSSATTI, F.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Genetic heterogeneity of the VP6 gene and predominance of G6P[5] genotypes of Brazilian porcine rotavirus C field strains. **Archives of Virology**, v. 161, n. 4, p. 1061-7, 2016.

QUINIQU, N.; DAGORN, J.; GAUDRÉ, D. Variation of piglets' birth weight and consequences on subsequent performance. **Livestock Production Science**, v. 78, n. 1, p. 63-70, 2002.

ROOKE, J.A.; BLAND, I.M. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. **Livestock Production Science**, v. 78, n. 1, p. 13-23, 2002.

SAIF, L.J. Non group A rotaviruses. In: **Viral diarrheas of man and animals**, L.J. Saif and K.W. Theil, Florida: CRC Press, p. 73-96, 1989.

STIPP, D.T.; ALFIERI, A.F.; LORENZETTI, E.; DA SILVA MEDEIROS, T.N.; POSSATTI, F.; ALFIERI, A.A. VP6 gene diversity in 11 Brazilian strains of porcine group C rotavirus. **Virus Genes**, v. 50, n. 1, p. 142-6, 2015.

SUZUKI, T.; HASEBE, A.; MIYAZAKI, A.; TSUNEMITSU, H. Phylogenetic characterization of VP6 gene (inner capsid) of porcine rotavirus C collected in Japan. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 26, p. 223-227, 2014.

TUBBS, R.C.; HURD, H.S.; DARGATZ, D.; AL., E. Prewaning morbidity and mortality in the United States swine herd. **Journal of Swine Health and Production**, v. 1, n. 1, p. 21-28, 1993.

WIELER, L.H.; ILIEFF, A.; HERBST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLOS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, n. 2, p. 151-9, 2001.

WITTUM, T.E.; DEWEY, C.E.; SCOTT HURD, H.; 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 and Production**, v. 3, n. 3, p. 99-104, 1995.

**4 CONCLUSÕES**



## 4 CONCLUSÕES

- Com esse trabalho foi possível estimar a incidência do RVC em leitões com até sete dias de idade, em uma granja no estado do Paraná, por meio de RT-PCR e evidenciar a importância do RVC como agente etiológico causador de infecção em leitões com até uma semana de idade;
- Não houve diferença estatística entre os grupos em relação aos critérios: ordem de parto, tamanho de leitegada, escore de diarreia e médias de peso do leitão ao nascer;
- Esse é o primeiro estudo longitudinal prospectivo sobre os aspectos epidemiológicos da infecção pelo RVC em leitões neonatos (com até sete dias).



## ANEXO A

### Lista de reagentes

1. Acetona, P.A. (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>) P.M. 58,08 (Dinâmica<sup>®</sup>)
2. Ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) P.M. 61,83 (Sicalab<sup>®</sup>)
3. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen<sup>®</sup>)
4. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>2H<sub>2</sub>O) P.M. 372,24 (Reagen<sup>®</sup>)
5. Agarose (*Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies*)
6. Água DEPC (Dietyl pirocarbonato) (*Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>*)
7. Álcool etílico absoluto (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) P.M. 46,07 (Nuclear<sup>®</sup>)
8. Álcool isoamílico ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) P.M. 88,15 (Synth<sup>®</sup>)
9. Azul de bromofenol (Sigma<sup>®</sup>)
10. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO<sub>3</sub>) P.M. 84,01 (Biotec<sup>®</sup>)
11. Brometo de etídio (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>Br) P.M. 394,3 (Sigma<sup>®</sup>)
12. Cloreto de cálcio puro (CaCl<sub>2</sub>) P.M. 110,94 (*Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies*)
13. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl<sub>2</sub>) (*Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>*)
14. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen<sup>®</sup>)
15. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen<sup>®</sup>)
16. Clorofórmio, P.A. (CHCl<sub>3</sub>) P.M. 119,38 (Dinâmica<sup>®</sup>)
17. Dióxido de sílica (SiO<sub>2</sub>) P.M. 60,08 (Sigma<sup>®</sup>)
18. *DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>)*
19. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 µL; 25 µmol cada (100 mM dATP *Solution*, 100 mM dCTP *Solution*, 100 mM dGTP *Solution*, 100 mM dTTP *Solution*) (*Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>*)
20. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S) P.M. 288,38 (Synth<sup>®</sup>)
21. Fenol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH) P.M. 94,11 (*Invitrogen Life Technologies<sup>™</sup>*)
22. Fosfato de sódio dihidratado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O) P.M 177,99 (Merck<sup>®</sup>)
23. Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> . 2H<sub>2</sub>O) P.M. 155,99 (Reagen<sup>®</sup>)
24. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) P.M. 141,96 (Synth<sup>®</sup>)
25. Glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) P.M. 180,16 (Reagen<sup>®</sup>)
26. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica<sup>®</sup>)
27. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab<sup>®</sup>)

28. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL<sup>®</sup>)
29. Metanol P.A. (CH<sub>3</sub>OH) P.M. 32,04 (Alkimia<sup>®</sup>)
30. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BMJ41 (*forward*; 5'-GCTTTAAAATCTCATTCA - 3', [nt] 1-20); Alfieri et al. (1999b) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*<sup>®</sup>)
31. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) BMJ42 (*reverse*; 5'-CTCTAGTTGATTGAACATA- 3', [nt] 251-270); Alfieri et al. (1999b) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*<sup>®</sup>)
32. PCR-*buffer* (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (*Invitrogen Life Technologies*<sup>™</sup>)
33. *Platinum Taq DNA Polymerase recombinant 500 units* (*Invitrogen Life Technologies*<sup>™</sup>)
34. *Quant-iT<sup>™</sup> dsDNA BR assay kit* (*Invitrogen Life Technologies*<sup>™</sup>)
36. Sacarose, P.A. – sucrose (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) P.M. 342,31 (Reagen<sup>®</sup>)
37. *Superscript<sup>™</sup> II - Reverse Transcriptase* – 200 unidades/μL (*Invitrogen Life Technologies*<sup>™</sup>)
38. Triton x-100

## ANEXO B

### Soluções e Tampões

#### **Diluição dos primers**

RT-PCR para amplificação parcial do gene VP6 do rotavírus C

*Primer Forward* - BMJ41

Concentração: 26,17 nmol

Data de fabricação: out/2009

$26,17 \times 1000 = 26170 \text{ pmol}$

$26170 / 200 = 130,85 \text{ } \mu\text{L}$  de água ultrapura

*Primer Reverse* – BMJ42

Concentração: 24,85 nmol

Data de fabricação: out/2009

$24,85 \times 1000 = 24850 \text{ pmol}$

$24850 / 200 = 124,25 \text{ } \mu\text{L}$  de água ultrapura

#### **Diluição de dNTP**

- Solução estoque (100 mM) – 250  $\mu\text{L}$  de cada dNTP
- Solução uso (10 mM) – 10  $\mu\text{L}$  da solução estoque + 90  $\mu\text{L}$  de água ultrapura

#### **Fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1)**

- 25 mL de fenol saturado em água
- 24 mL de clorofórmio
- 1 mL de álcool isoamílico

#### **Gel de agarose 1-2%**

- 0,5-1 g de agarose
- 50 mL de tampão TBE 1x
- 25  $\mu\text{L}$  de brometo de etídio

**Hidratação da sílica**

- 12 g de sílica
- Adicionar 100 mL de água bidestilada autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 88 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 100 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 88 mL do sobrenadante
- Ajustar o pH (pH 2,0)
- Aliquotar

**SDS 10%**

- 5 g dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ )
- água bidestilada q.s.p. 50 mL

**Solução L6**

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

**Solução L2**

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

**Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose – sucrose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ) 45%
- Água bidestilada q.s.p. 100 mL

**Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**

- Tris 0,89 M
- Ácido bórico 0,89 M
- EDTA 0,02 M
- água bidestilada q.s.p. 1 litro

- ajustar o pH (pH 8,4)

**Tampão de estabilização para o rotavírus (TRIS/Ca<sup>++</sup>) 10 x - pH 7,2**

- 12,12 g de TRIS (0,89mM)
- 2,2 g de cloreto de cálcio (1,5 mM)
- Água bidestilada autoclavada q.s.p. 1L

## ANEXO C

### Protocolos e Técnicas

#### Extração do ácido nucleico pela associação das técnicas fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina

##### 1. Suspensão fecal – extração bruta

- 100 mL ou 100 mg de fezes
- 500 mL de TRIS/Ca<sup>++</sup> 1x
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar a 5.000 x g / 3 min
- Utilizar 500 µL do sobrenadante para extração

##### 2. Extração do ácido nucleico

###### Fase I – Fenol

- 500 mL da suspensão fecal
- Adicionar 50 µL de SDS 10%
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56°C / 20 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 500 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56°C / 15 min
- Homogeneizar manualmente por 15 s
- Centrifugar 10.000 x g / 10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo

###### Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

- Adicionar 500 mL da solução L6
  - Adicionar 25 µL de sílica hidratada
  - Homogeneizar em *vortex*
  - Agitar em temperatura ambiente / 30 min
- Centrifugar 10.000 x g / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
  - Adicionar 500 mL de solução L2

- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 mL de solução L2
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 1000 mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 mL de acetona P. A. gelada
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x *g* / 30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60°C (aproximadamente 2 min)
- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56°C / 15 min
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 13.000 x *g* / 4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
- Estocar -20°C até a utilização

## RT-PCR para amplificação parcial do gene VP6 do rotavírus C

- *Mix* de desnaturação

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Primer Forward</i> (20 pmol)	1
<i>Primer Reverse</i> (20 pmol)	1
Água DEPC	3
RNA	5
Volume final	10

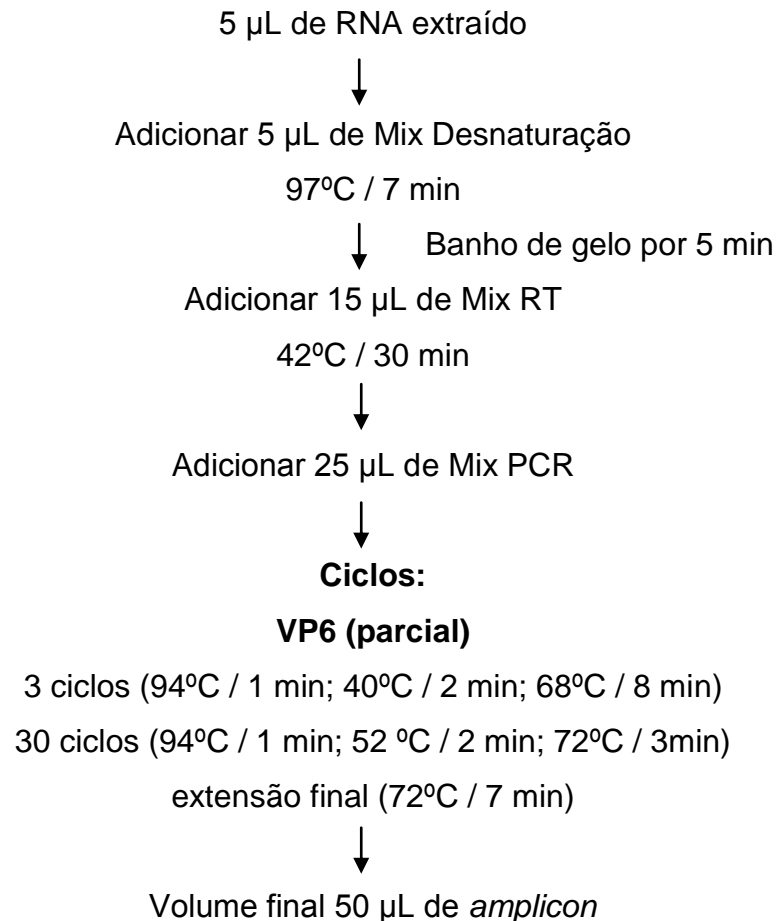
- *Mix* de RT

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Super Script</i> (5U / µL)	0,15
<i>Primer Forward</i> (20 pmol)	0,5
<i>Primer Reverse</i> (20 pmol)	0,5
Água DEPC	5,85
Produto da desnaturação	10
Volume final	25

*Mix* de PCR

<b>Reagentes</b>	<b>Volume (µL)</b>
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	2,5
dNTP (2,5 mM)	4
<i>Platinum® Taq DNA Polymerase</i> (5U / µL)	0,25
Água DEPC	18,25
cDNA	25
Volume final	50

## Esquema do programa de RT-PCR utilizado para amplificação parcial do gene VP6 do rotavírus C



### Eletoforese em gel de agarose a 1-2%

- 0,5 -1 g de agarose
- 50 mL TBE *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8,4
- 25  $\mu$ L de brometo de etídio (0,5  $\mu$ g / mL)

São utilizados 8  $\mu$ L do *amplicon* e 2  $\mu$ L do tampão de amostra. A eletroforese sobvoltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes ocorre em aproximadamente 40 min.