



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA TORRES TOMAZI FRITZEN

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DOS GENOTIPOS G (VP7)
E P (VP4) DE ROTAVÍRUS A EM REBANHOS BOVINOS
LEITEIROS VACINADOS CONTRA ROTAVIROSE**

Londrina
2018

JULIANA TORRES TOMAZI FRITZEN

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DOS GENOTIPOS G (VP7)
E P (VP4) DE ROTAVÍRUS A EM REBANHOS BOVINOS
LEITEIROS VACINADOS CONTRA ROTAVIROSE**

Tese 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
Doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Londrina
2018

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

Fritzen, Juliana Torres Tomazi .

Vigilância epidemiológica dos genótipos G (VP7) e P (VP4) de rotavírus A em rebanhos leiteiros vacinados contra rotavirose / Juliana Torres Tomazi Fritzen. - Londrina, 2018. 79 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Bezerra - Tese. 2. Diarréia Neonatal - Tese. 3. RVA - Tese. 4. Vacina - Tese. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

JULIANA TORRES TOMAZI FRITZEN

**VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DOS GENOTIPOS G (VP7) E P
(VP4) DE ROTAVÍRUS A EM REBANHOS BOVINOS LEITEIROS
VACINADOS CONTRA ROTAVIROSE**

Tese 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
Doutora em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Marlise Pompeo Claus
Instituto Federal Catarinense - IFC

Profa. Dra. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr. Rodrigo Alejandro Arellano Otonel
Venco Saúde Animal

Profa. Dra. Michele Lunardi
Universidade de Cuiabá - UNIC

Londrina, 27 de abril de 2018.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal e Laboratório Multiusuário em Saúde Animal – Unidade de Biologia Molecular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de doutora em Ciência Animal pelo Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo 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
- 5. INCT-Leite:** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite

Ao meu marido, Eduardo.
Aos meus filhos, Julia e Mateus.
Aos meus pais, Zelma e Nelson.

AGRADECIMENTOS

A minha família, que sempre foi meu alicerce para que eu conseguisse traçar os caminhos que desejei. Primeiro meus pais e depois meu marido e filhos. A difícil jornada de estudar não se faz sozinho, sempre existe a necessidade de suporte, principalmente emocional, para percorrer todo o caminho.

Ao professor Amauri Alcindo Alfieri, que aceitou ser meu orientador e que me conduziu nesse caminho que me trouxe até aqui, pelos ensinamentos e pela sua imensa capacidade de pensar além, de nos fazer pensar diferente.

À professora Alice Fernandes Alfieri, pela colaboração na banca de qualificação e pela atenção sempre dada, buscando sempre a melhor solução, com muita dedicação e respeito.

Aos colegas de trabalho e também amigos, Caio Abércio da Silva e Cesar Feronato, que colaboraram diretamente para o início do doutorado e que foram peças importantíssimas para o meu desenvolvimento profissional. À todos aqueles de que alguma forma fizeram parte dessa primeira etapa.

Aos meus amigos de trabalho, Marcos Vinicius de Oliveira e Renilda Calabrio Cianca, pelo incansável apoio, nos diferentes projetos e nas diferentes ideias dentro dos diferentes projetos.

Aos que passaram e aos que ainda fazem parte do Laboratório de Virologia Animal, pela convivência e aprendizado compartilhado durante todos esses anos.

Aos membros da banca de qualificação e amigos, Elis Lorenzetti, Selwyn Arlinton Headley e Edsel Alves Beuttemmuller, pela colaboração na correção e nos diferentes auxílios durante a caminhada, com a execução e pensamentos.

Aos amigos e membros da banca de defesa, Marlise Pompeo Claus, Rodrigo Alejandro Arellano Otonel, Michele Lunardi e Elis Lorenzetti que aceitaram colaborar com o aprimoramento desta tese.

À Deus por colocar todas essas pessoas em meu caminho para que me transforme e me torne uma pessoa melhor.

Muito obrigada!

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica a nossa ignorância.”

John F. Kennedy

RESUMO

FRITZEN, Juliana Torres Tomazi. **Vigilância epidemiológica dos genótipos G (VP7) e P (VP4) de rotavírus A em rebanhos bovinos leiteiros vacinados contra rotavirose**. 2018. 79f. Tese (Doutorado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A diarreia neonatal bovina (DNB) é uma enfermidade multifatorial que, com maior frequência, acomete bezerras com até 30 dias de idade. A DNB é o principal evento sanitário em bezerras leiteiras lactentes e devido às taxas de morbidade e mortalidade a infecção ocasiona perdas econômicas consideráveis à cadeia produtiva do leite. O principal agente infeccioso viral envolvido na etiologia dessa enfermidade é o rotavírus A (RVA). Entre as várias medidas de controle e profilaxia a serem adotadas para a redução da frequência de DNB em rebanhos bovinos leiteiros destaca-se a vacinação das vacas no período pré-parto. O objetivo desse estudo foi monitorar os genótipos G (VP7) e P (VP4) de cepas de RVA identificadas em bezerras leiteiras em rebanhos regularmente vacinados com vacina comercial contendo RVA genótipo G6P[5]. Para isso, foram conduzidos dois experimentos sendo o primeiro de caráter longitudinal e o segundo transversal. No primeiro experimento, 122 bezerras provenientes de um rebanho da raça Holandesa foram avaliadas até os 30 dias de idade. Em todas as bezerras, independentemente da presença ou ausência de DNB, nos dias 1, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28 e 30 de idade foram realizadas colheitas de amostras fecais totalizando 1.220 amostras. O segundo experimento foi realizado em 14 rebanhos bovinos leiteiros regularmente vacinados contra a rotavirose, e em cada rebanho foi realizada apenas uma colheita de amostras fecais diarreicas ($n=87$) em bezerras de até 30 dias de idade. Como técnica de triagem, a presença de RVA nas amostras fecais foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). Todas as amostras positivas para RVA por EGPA foram submetidas à amplificação dos genes VP7 e VP4 por RT-PCR e os genótipos G e P, respectivamente foram determinados por sequenciamento dos produtos amplificados e análise das sequências obtidas. No experimento longitudinal foram identificados 76 (62,3%) e 99 (8,1%) animais e amostras fecais positivas para RVA, respectivamente. Todas as amostras RVA-positivas ($n=10$) selecionadas para o sequenciamento foram caracterizadas como genótipo G10P[11]. No experimento transversal somente 42,86% (6/14) das propriedades foram analisadas. Oito rebanhos foram excluídos do estudo, por não apresentarem bezerras com diarreia ($n=2$) ou por não apresentarem amostras fecais positivas para RVA ($n=6$). Nos seis rebanhos restantes, 17 (25,4%) amostras de fezes foram positivas para RVA. O sequenciamento e análise filogenética dos produtos amplificados dos genes VP7 e VP4 possibilitaram identificar os genótipos G6P[11] em cinco rebanhos e G10P[11] em um. As cepas G6 pertencem a linhagem III enquanto a cepa G6 vacinal pertence a linhagem IV, caracterizando a ocorrência nos rebanhos vacinados de RVA genótipo G6 distinto daquele presente na cepa vacinal. Adicionalmente, nestes rebanhos vacinados com RVA genótipo G6P[5] foi observada a emergência dos genótipos G10 e P[11] caracterizando possível falha na proteção heteróloga. Os resultados, tanto do experimento longitudinal quanto do transversal, demonstraram que nos rebanhos bovinos regularmente vacinados com a cepa G6P[5] de RVA houve redução na frequência de diarreia em bezerras com idade inferior a 30 dias. Contudo, houve circulação de RVA com genótipos G e P distintos daqueles presentes na cepa vacinal. Com isso, evidencia-se a importância do constante monitoramento das cepas de RVA circulantes em rebanhos bovinos regularmente vacinados e também da realização de estudos de vigilância epidemiológica para a identificação de genótipos emergentes e para a caracterização molecular de cepas de RVA com maior virulência e/ou com potencial zoonótico.

Palavras chave: Bezerro, diarreia neonatal, RVA, genótipo, vacina.

ABSTRACT

FRITZEN, Juliana Torres Tomazi. **Epidemiological surveillance of G (VP7) and P (VP4) genotypes in rotavirus A field strains circulating in rotavirus vaccinated dairy cattle herds.** 2018. 79p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science; Concentration Area: Animal Health) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Neonatal calf diarrhea (NCD) is a multifactorial disease that most frequently affects calves up to 30 days old. The NCD is the main health event in suckling calves and due to the morbidity and mortality rates, the infection causes considerable economic losses to the milk production chain worldwide. The main viral infectious agent involved in the etiology of this syndrome is rotavirus A (RVA). Among the several measures of control and prophylaxis to be adopted to reduce the frequency of NCD in dairy cattle herds stands out the vaccination of cows in the dry period. The aim of this study was to monitor the genotypes G (VP7) and P (VP4) of RVA strains identified in heifer calves in dairy cattle herds regularly vaccinated with commercial vaccine containing RVA genotype G6P[5]. For this, two experiments were conducted, the first being of longitudinal design and the second cross-sectional. In the first experiment, 122 heifer calves up to 30 days old from a Holstein breed were evaluated. In all calves, regardless of the presence or absence of NCD, fecal samples were collected on days 1, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, and 30, totaling 1,220 samples. The second experiment was performed on 14 dairy cattle herds regularly vaccinated against RVA, and in each herd, only one diarrheic fecal sample ($n=87$) was collected in heifer calves with NCD. As screening test, the presence of RVA in fecal samples was evaluated by the polyacrylamide gel electrophoresis technique (PAGE). All the positive diarrheic fecal samples for RVA in the screening test were submitted to the amplification of the VP7 and VP4 genes by RT-PCR and the genotypes G and P, respectively were determined by sequencing of the amplified products and analyzes of nucleotide sequence obtained. In the longitudinal experiment were identified 76 (62.3%) and 99 (8.1%) calves and fecal samples positives for RVA, respectively. All RVA-positive samples ($n=10$) selected for sequencing were characterized as genotype G10P[11]. In the cross-sectional experiment, only 42.9% (6/14) of herd were analyzed. Eight herds were excluded from the study because they did not present heifer calves with diarrhea ($n=2$) or because they did not present RVA positive fecal samples ($n=6$). In the remaining six herds, 17 (25.4%) diarrheic fecal samples were positive for RVA. Sequencing and phylogenetic analysis of the VP7 and VP4 genes amplified products allowed to identify the genotype G6P[11] in five herds and the genotype G10P[11] in one. The genotype G6 of RVA field strains migrated into a cluster (lineage III) distinct from the G6 vaccine strain (lineage IV), characterizing the occurrence of G6 genotype phylogenetic distant in vaccinated herds. Additionally, in these herds vaccinated with RVA genotype G6P[5] was observed the emergence of the genotypes G10 and P[11], characterizing a possible failure in heterologous protection. The results of both the longitudinal and cross-sectional experiments showed that in dairy cattle herds regularly vaccinated with the RVA genotype G6P[5] there was a reduction in the frequency of diarrhea in calves up to 30-day-old. However, there were circulations of RVA field strains with different G and P genotypes than those present in the vaccine strain. Thus, it highlights the importance of constant monitoring of RVA strains circulating in regularly vaccinated cattle herds, as well as epidemiological surveillance studies for the identification of emergent genotypes and for the molecular characterization of highly virulent RVA strains and/or strains with zoonotic potential.

Key words: calf, neonatal diarrhea, RVA, genotype, vaccine.

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1.** Esquema do perfil de migração dos 11 segmentos de dsRNA de rotavírus A, suas proteínas codificadas e funções..... 19
- Figura 2.** Diagrama da estrutura da partícula do rotavírus..... 20
- Figura 3.** Árvore filogenética do gene VP7 de RVA, reconstruída utilizando 922 pb do genotipo G6 das cepas de referência disponíveis no *GenBank*, subdividida em seis linhagens. O método utilizado para a reconstrução foi *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter*. Os protótipos das vacinas, contendo G6 genotipo, disponíveis comercialmente no Brasil estão indicados por um quadrado preto. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram omitidos. A cepa de RVA B223 genotipo G10P[11], também incluída em algumas vacinas, foi utilizada como *outgroup*. O número de acesso no *GenBank* está colocado após cada nome de sequência..... 23
- Figura 4.** Árvore filogenética do gene VP7 de RVA, reconstruída utilizando 979 pb do genotipo G10 das cepas de referências disponíveis no *GenBank*, subdividida em dez linhagens. O método utilizado para a reconstrução foi *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter*. O protótipo da vacina, contendo genotipo G10, disponível comercialmente no Brasil está indicado por um quadrado preto. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram omitidos. A cepa de RVA UK genotipo G6P[5] foi utilizada como *outgroup*. O número de acesso no *GenBank* está colocado após cada nome de sequência..... 24
- Figura 5.** Árvore filogenética do gene VP4 de RVA, reconstruída utilizando 644 pb do genotipo P[5] das cepas de referências disponíveis no *GenBank*, subdividida em nove linhagens. O método utilizado para a reconstrução foi *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter*. O protótipo da vacina, contendo o genotipo P[5], disponível comercialmente no Brasil está indicado por um quadrado preto. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram omitidos. A cepa de RVA NCDV genotipo G6P[1] foi utilizada como *outgroup*. O número de acesso no *GenBank* está colocado após cada nome de sequência..... 25
- Figura 6.** Árvore filogenética do gene VP4 de RVA, reconstruída utilizando 644 pb do genotipo P[11] das cepas de referências disponíveis no *GenBank*, subdividida em seis linhagens. O método utilizado para a reconstrução foi *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter*. O protótipo da vacina, contendo o genotipo P[11], disponível comercialmente no Brasil está indicado por um quadrado preto. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram omitidos. O número de acesso no *GenBank* está colocado após cada nome de sequência..... 26

ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.2. Cross-sectional study of G and P genotypes of rotavirus A field strains circulating in regularly vaccinated dairy cattle herds

Figure 1. Phylogenetic tree of the VP7 gene of RVA, reconstructed using 830bp of genotype G6 of the Y199 and Y263 strains, represented by a black circle, and reference strains available in GenBank. The prototypes of Brazilian vaccines are indicated by a black square. The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of bootstrap support (1,000 replicates) for the clusters. Bootstrap values less than 50% are not shown. The strain used as outgroup was the prototype strain B223 (G10P[11]). The GenBank accession number were subsequent to the name of the sequences..... 58

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Quantidade (em L) e valor dos produtos de origem animal e variação anual, Brasil - 2015-2016..... 15

Tabela 2. Produção, consumo, exportação e importação de leite (milhões de litros) no Brasil entre os anos de 2016 e 2018..... 15

Tabela 3. Valor de corte, em porcentagem de identidade de nucleotídeos, letra utilizada para identificar e descrição do nome do genotipo para cada uma das 11 proteínas de rotavírus A e o número de genotipos descritos para cada segmento..... 21

ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1. Longitudinal surveillance of rotavirus genotype circulating in a dairy cattle herd post rotavirus vaccine introduction

Table 1. Distribution of the total sampling and the number of rotavirus A positive fecal samples by fecal consistency scores and the age of the calf at the time of sample collection from heifer calves born from a rotavirus vaccinated high milk yield dairy cattle herd, Brazil, 2017..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa -	<i>Amino acid</i> (Aminoácido)
bp-	<i>Base pair</i> (pares de base)
DNB -	Diarreia neonatal bovina
dsRNA -	<i>double strand RNA</i> (RNA fita dupla)
EMBRAPA -	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FAO -	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FTIP -	Falha na transferência da imunidade passiva
IBGE -	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
NSP -	<i>Nonstructural protein</i> (Proteína não estrutural)
nt -	<i>Nucleotide</i> (Nucleotídeo)
NCD -	<i>Neonatal calf diarrhea</i> (Diarreia neonatal bovina)
OIE -	<i>World Organisation for Animal Health</i> (Organização Mundial de Saúde Animal)
PAGE -	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Eletroforese em gel de poliacrilamida)
RCWG -	<i>Rotavirus Classification Working Group</i>
RdRp -	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR -	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)
RV -	Rotavírus
RVA -	Rotavírus A
VP -	<i>Viral protein</i> (proteína viral)

1. REVISÃO DE LITERATURA	
1.1. INTRODUÇÃO.....	15
1.2. DIARREIA NEONATAL BOVINA.....	16
1.3. ROTAVÍRUS.....	18
1.3.1. Rotavírus A (RVA).....	21
1.3.1.1. Genotipo G.....	22
1.3.1.2. Genotipo P.....	22
1.3.1.3. Associações de genotipo G e P.....	26
1.4. PROFILAXIA.....	27
1.5. REFERÊNCIAS.....	30
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral.....	39
2.2. Objetivos Específicos.....	39
3. ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	
3.1. <i>Longitudinal surveillance of rotavirus genotype circulating in a dairy cattle herd post rotavirus vaccine introduction</i>	41
Abstract.....	42
Introduction.....	43
Materials and Methods.....	43
Herd information.....	43
Cows vaccination.....	44
Fecal samples.....	44
Evaluation of RVA presence.....	44
RVA genotyping.....	44
Results and discussion.....	45
References.....	48
3.2. <i>Cross-sectional study of G and P genotypes of rotavirus A field strains circulating in regularly vaccinated dairy cattle herds</i>	52
Abstract.....	53
Introduction.....	54
Materials and Methods.....	55
Dairy cattle herd and fecal samples.....	55
RVA diagnosis.....	55
Sequencing.....	55
Results and discussion.....	56
References.....	59
4. CONCLUSÕES	
5. ANEXOS	
5.1. Lista de reagentes.....	67
5.2. Soluções e tampões.....	69
5.3. Protocolo de técnicas.....	72
5.4. Lista de <i>softwares</i>	79

1 REVISÃO DE LITERATURA

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

Em 2016, o Brasil possuía um efetivo bovino de 218.225.177 cabeças, sendo que os estados do Mato Grosso (13,88%), Minas Gerais (10,83%) e Goiás (10,48%) são os que apresentavam o maior número de animais (IBGE, 2017). Com relação à pecuária leiteira, também em 2016, foram ordenhadas 19.678.817 vacas, sendo que os maiores rebanhos pertenciam aos estados de Minas Gerais (25,28%), Goiás (10,59%) e Paraná (8,24%) (IBGE, 2017). A produção leiteira brasileira em 2016 foi superior a 33 bilhões de litros de leite, gerando renda superior a 39 bilhões de reais (aproximadamente 12 bilhões de dólares) (Tabela 1).

Tabela 1. Quantidade (em L) e valor dos produtos de origem animal e variação anual, Brasil - 2015-2016.

Produtos	Quantidade produzida em litros		Variação anual 2016 / 2015 (%)	Valor (1.000 R\$)		Variação anual 2016 / 2015 (%)
	2015	2016		2015	2016	
Leite produzido (1.000 litros)	34 609 588	33 624 653	-2,8	34 231 997	39 441 516	15,2

Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2015-2016.

O Brasil, em 2016, ocupava a quarta posição com relação à produção mundial de leite e a primeira na América do Sul. Avaliando os dez maiores produtores de leite, o Brasil ocupa a nona posição em produção de leite por vaca e a segunda em número de vacas ordenhadas, precedido somente pela Índia (FAO, 2017).

O Brasil tem buscado diminuir a importação de produtos lácteos e aumentar a exportação e por ser um mercado em desenvolvimento a projeção é de aumento no setor (Tabela 2).

Tabela 2. Produção, consumo, exportação e importação de leite (milhões de litros) no Brasil entre os anos de 2016 e 2018.

Ano	Produção		Consumo		Exportação		Importação	
	Projeção	L sup.	Projeção	L sup.	Projeção	L sup.	Projeção	L sup.
2016/17	34.520	36.005	35.974	37.735	245	618	1.909	3.135
2017/18	35.334	37.435	36.776	39.517	254	781	1.937	3.671

Fonte: Elaboração por CGEA/DCEE/SPA/MAPA e SGI/Embrapa com dados do IBGE; MDIC/Aliceweb; Embrapa Gado de Leite.

L sup = Limite superior

A tecnificação da pecuária leiteira, tanto com relação à genética e ao número de animais ordenhados quanto aos aspectos relativos à nutrição, manejo e instalações, tem como objetivos principais o aumento da produção e, principalmente, da produtividade dos rebanhos bovinos leiteiros. Porém, a criação intensiva pode expor a uma série de fatores de riscos com reflexos negativos no perfil sanitário do rebanho. Neste contexto destaca-se o aumento da ocorrência e na intensidade de doenças já existentes e, principalmente, o surgimento de novas doenças, algumas das quais com potencial zoonótico levando risco a saúde pública (Alfieri, 2008).

No aspecto sanitário várias enfermidades podem comprometer os rebanhos bovinos leiteiros. Algumas enfermidades são específicas de determinadas categorias, como bezerras lactentes e desmamadas, novilhas e vacas; outras podem ser classificadas de acordo com a sua apresentação como as doenças endêmicas e epidêmicas ou as doenças de caráter agudo e crônico; podem também estar relacionadas às falhas no manejo ou deficiências nutricionais; entre outras categorias de classificação como, por exemplo, aquela que é relacionada ao sistema orgânico ou até mesmo ao órgão envolvido (Alfieri, 2008).

Neste sentido, particularmente na pecuária bovina leiteira, destacam-se aquelas infecções que acometem a glândula mamária e os dígitos. Ambas ocorrem em animais adultos e comprometem diretamente a produção e produtividade. Devido à frequência de ocorrência, as mastites e as afecções podais são consideradas os principais desafios sanitários em rebanhos bovinos leiteiros (Silveira *et al.*, 2009; Langoni *et al.*, 2017).

Ainda de acordo com a faixa etária podemos destacar as infecções que ocorrem no sistema digestório, particularmente a porção entérica; o sistema respiratório; e o sistema reprodutivo. Todas essas infecções são multietiológicas, ou seja, podem ser ocasionadas por várias classes de micro-organismos como bactérias, vírus e protozoários, e multifatoriais, pois sua ocorrência e, principalmente, a sua intensidade e/ou gravidade podem sofrer influências de aspectos relacionados ao manejo, nutricionais e imunológicos (Alfieri, 2008).

Dentre as enfermidades entéricas as diarreias neonatais são as mais frequentes e importantes afecções em bezerras lactentes podendo acarretar prejuízos à toda cadeia produtiva do leite em virtude dos custos adicionais na criação de bezerras e na evolução genética dos rebanhos (Alfieri *et al.*, 2006; Alfieri, 2008; Cho e Yoon, 2014).

1.2. DIARREIA NEONATAL BOVINA

A diarreia neonatal bovina (DNB) é uma síndrome multifatorial que envolve fatores não infecciosos (imunológicos, manejo sanitário e nutricional) e infecciosos (Barry *et al.*,

2009). Os principais micro-organismos envolvidos na etiologia de DNB são vírus, bactérias e protozoários (Coura *et al.*, 2015; Abuelo, 2016). A DNB, associada às doenças respiratórias, são as principais causas de morbidade e mortalidade em bezerras em rebanhos bovinos leiteiros em todo o mundo (Windeyer *et al.*, 2014).

Partículas virais classificadas em dezenas de gêneros podem ser identificadas em conteúdo intestinal de bezerras sem e, principalmente, com diarreia. Porém, tanto em rebanhos bovinos leiteiros quanto de corte, rotavírus A (RVA) seguido de coronavírus representam as principais etiologias virais de DNB (Asano *et al.*, 2010; Uetake, 2013).

Rotavírus é um micro-organismo ubíquo nos rebanhos bovinos de todo o mundo (Papp *et al.*, 2013). Aspectos relacionados ao manejo dos bezerros podem ser fatores de risco, pois falhas em processos de higiene e sanitização do ambiente podem levar ao aumento da dose viral infecciosa presente no ambiente, instalações e utensílios, desencadeando o processo de infecção (Bartels *et al.*, 2010; Al Mawly *et al.*, 2015). Além da dose infecciosa e da resistência ambiental do vírus, outro importante aspecto relacionado ao micro-organismo é a sua virulência. No campo circulam cepas de RVA com perfis de virulência distintos e, com isso, em algumas situações são observados sinais clínicos brandos e em outras a infecção pode manifestar-se como um grave surto de DNB (Brito *et al.*, 2000; Buzinaro *et al.*, 2003; Alfieri *et al.*, 2006; Medeiros *et al.*, 2014).

Com relação às bezerras, particularmente na pecuária leiteira, a imunidade passiva é um aspecto que assume grande importância tanto na ocorrência quanto na intensidade dos episódios de DNB (Parreno *et al.*, 2004). A falha na transferência da imunidade passiva (FTIP) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de diarreia em bezerras lactentes (Meganck *et al.*, 2014). As FTIP podem ser quantitativas, quando as bezerras recebem quantidade de colostro inferior ao necessário em relação ao seu peso corporal ou quando recebem quantidade adequada em um período de tempo inadequado, ou seja, após o fechamento da barreira celular intestinal que impede a absorção de macromoléculas como os anticorpos. A principal FTIP classificada como qualitativa é relacionada ao título de anticorpos presentes no colostro que são especificamente direcionados contra os principais agentes etiológicos de DNB (Van Zaane *et al.*, 1986; Matsuda *et al.*, 1993; Parreno *et al.*, 2004; Durel *et al.*, 2017). O manejo correto do fornecimento de colostro e a vacinação das vacas no período pré-parto são ações que reduzem a ocorrência de FTIP tanto em termos quantitativos quanto qualitativos, respectivamente (Parreno *et al.*, 2004; Alfieri *et al.*, 2006; Meganck *et al.*, 2014).

A idade também é outro fator ligado ao hospedeiro que predispõe a infecção por RVA (Greenberg e Estes, 2009). Na espécie bovina, bezerras lactentes com uma a três semanas de

idade são as mais susceptíveis à infecção entérica (Alfieri *et al.*, 2006; Meganck *et al.*, 2014; Coura *et al.*, 2015). Em animais mais velhos a infecção também pode ocorrer, porém é menos frequente (Coura *et al.*, 2015).

A DNB acarreta em aumento nos custos de produção dos bezerros em virtude de vários aspectos, destacando-se entre eles o custo com medicamentos e com horas de trabalho no manejo de animais sintomáticos para o tratamento; além das interferências negativas na conversão alimentar e no ganho de peso (Bartels *et al.*, 2010). Além de todas essas consequências, existe ainda o risco de mortes eventuais, principalmente na pecuária leiteira, que interfere na taxa de evolução do rebanho tanto em termos numéricos quanto, principalmente, de manutenção genética do rebanho (Dhama *et al.*, 2009; Izzo *et al.*, 2011).

O impacto negativo que essa síndrome acarreta na pecuária bovina pode ser minimizado com a utilização de boas práticas na criação das bezerras que incluem, ambientes adequados; limpeza e desinfecção de ambientes, instalações e utensílios; monitoramento da colostragem e incremento da imunidade passiva por meio da vacinação das vacas ao final da gestação (Alfieri *et al.*, 2006; Bartels *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011; Cho e Yoon, 2014; Al Mawly *et al.*, 2015).

1.3 ROTAVÍRUS

Rotavírus (RV) é considerado a principal causa viral de DNB em todo o mundo (Okada e Matsumoto, 2002; Martella *et al.*, 2006; Alkan *et al.*, 2010; Badaracco *et al.*, 2012; Medeiros *et al.*, 2015). O gênero *Rotavirus* é membro da família *Reoviridae* (ICTV, 2017) e possui o genoma composto por 11 segmentos de RNA fita dupla (*dsRNA*), que codificam 12 proteínas, sendo seis estruturais (VP1-VP4, VP6-VP7) e seis não estruturais (NSP1-NSP6) (Greenberg e Estes, 2009). Cada segmento genômico codifica uma proteína, com exceção do segmento 11 que codifica duas proteínas (Matthijnssens *et al.*, 2008b). A proteína codificada por cada segmento de rotavírus e a sua função são apresentadas na figura 1.

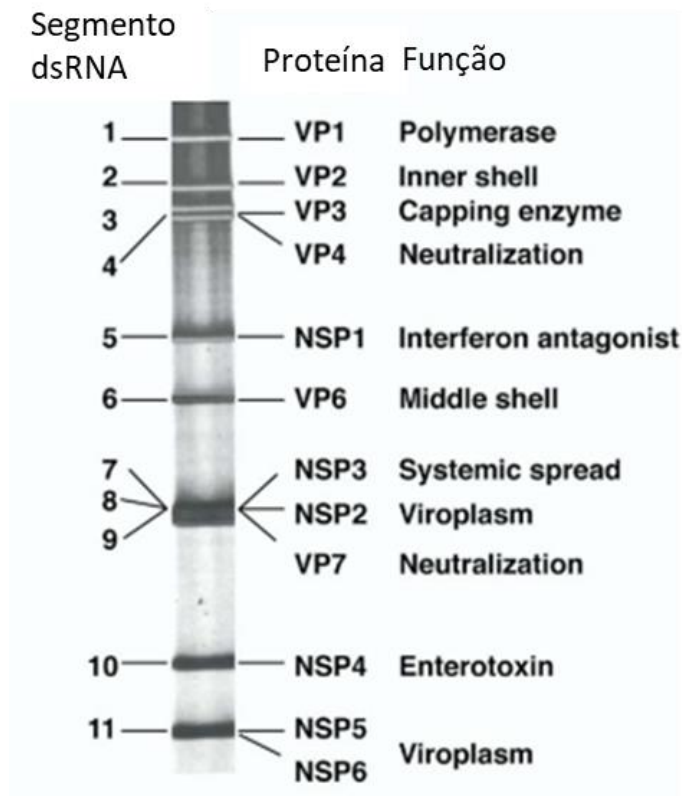


Figura 1. Esquema do perfil de migração dos 11 segmentos de dsRNA de rotavírus A, proteínas codificadas e funções.

Fonte: Adaptado de Greenberg e Estes (2009).

A partícula viral, descrita por Mebus *et al.* (1969), consiste de tripla camada proteica composta por (Figura 2):

i) Camada interna (*core* ou núcleo), composta por proteínas associadas ao genoma viral. VP1 é a proteína RNA polimerase dependente de RNA (RdRp); VP2 a proteína mais abundante, unida ao RNA, com função de formação do nucleocapsídeo; e VP3 apresenta atividade de guanililtransferase (adiciona resíduos a estrutura cap 5' dos RNAs mensageiros).

ii) Camada intermediária, composta pela proteína VP6, representa cerca de 50-60% da massa viral, utilizada para determinação de espécie/grupo.

iii) Camada externa, composta pela proteína VP4, uma proteína sensível à protease, que possui um sítio de clivagem pela tripsina e gera duas proteínas VP5* e VP8*, responsáveis pelo aumento da infectividade viral e também pela determinação do genotipo P (*protease sensitive*); e pela proteína VP7, uma glicoproteína envolvida no processo de penetração do vírus na célula, responsável pela determinação do genotipo G (*glycoprotein*). Essas duas proteínas são consideradas imunogênicas pois induzem a formação de anticorpos neutralizantes.

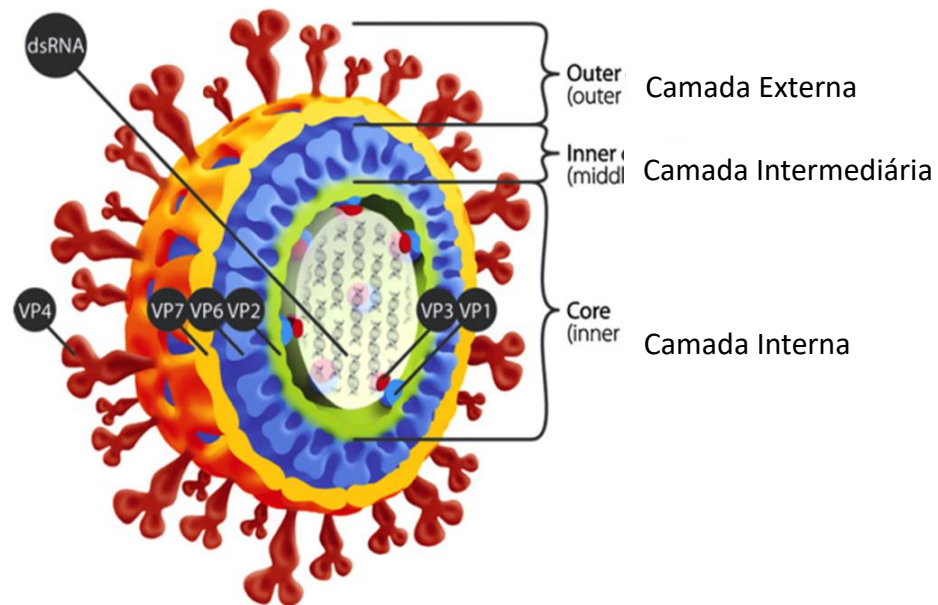


Figura 2. Diagrama da estrutura da partícula de rotavírus.

Fonte: Adaptado de Usonis *et al.* (2012)

A ausência de envelope e a tripla camada proteica fazem com que a partícula viral tenha alta resistência no ambiente. A tripla camada proteica também confere ao vírus resistência ao ambiente ácido do estômago e às enzimas digestivas no intestino. O vírus infecta as vilosidades (enterócitos maduros) do duodeno/jejuno por endocitose. Os principais genes envolvidos na infectividade viral são 3 (VP3), 4 (VP4), 5 (NSP1), 9 (VP7) e 10 (NSP4). O gene 3, que codifica a VP3, atua na replicação do RNA viral, os genes 4 e 9 (codificam as proteínas VP4 e VP7, respectivamente) são expressos como proteínas da camada externa do capsídeo que iniciam a infecção. O gene 5 codifica a proteína NSP1 que é antagonista de interferon, importante na imunidade contra o vírus, e o gene 10 codifica a proteína NSP4 que regula a homeostase do cálcio, a replicação viral e é uma potente enterotoxina viral (Greenberg e Estes, 2009).

Rotavírus é classificado com base na proteína VP6 em nove espécies/grupos (A-I) aceitos pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2017). Em 2017 foi proposto o décimo grupo (J) descrito em morcegos (Banyai *et al.*, 2017). Os grupos A, B, C e H acometem humanos e animais e os grupos D-G e I-J, até o momento, foram descritos apenas em animais. RVA é o grupo mais frequentemente em amostras fecais diarreicas em humanos e animais, incluindo bovinos. Porém, rotavírus B e C também já foram descritos em bovinos (Ghosh *et al.*, 2007; Otto *et al.*, 2015).

1.3.1 Rotavírus A (RVA)

As proteínas VP7 (glicoproteína) e VP4 (sensível a protease), independentemente, induzem anticorpos neutralizantes envolvidos na imunidade protetora contra a infecção e são utilizadas, assim como os seus respectivos genes, para a classificação binária, um importante sistema empregado para a classificação das cepas de RVA em sorotipos / genótipos G e P, respectivamente. Atualmente, são aceitos pelo *Rotavirus Classification Working Group* (RCWG, 2017) 36 genótipos G e 51 genótipos P. Porém, o número total de genótipos é constantemente alterado pela descrição de novos genótipos.

A definição de toda a constelação de genótipos foi proposta como uma nova classificação das cepas de RVA que tem por base a análise comparativa da porcentagem de identidade da sequência de nucleotídeos dos 11 segmentos genômicos com sequências de cepas disponíveis no *GenBank*, seguindo a seguinte ordem VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6, ou seja, genótipos Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (Matthijssens *et al.*, 2008a) (Tabela 3).

Tabela 3. Valor de corte, em porcentagem de identidade de nucleotídeos, letra utilizada para identificar e descrição do nome do genótipo para cada uma das 11 proteínas de rotavírus A e o número de genótipos descritos para cada segmento.

Segmento	Proteína codificada	% valor de corte de identidade de nucleotídeos	Genótipo	Descrição do nome do genótipo, baseado no produto gênico	Número de genótipos aceitos pelo RCWG
1	VP1	83	R	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>	22
2	VP2	84	C	<i>Core shell protein</i>	20
3	VP3	81	M	<i>Methyltransferase</i>	20
4	VP4	80	P	<i>Protease sensitive</i>	51
5	NSP1	79	A	<i>Interferon antagonist</i>	31
6	VP6	80	I	<i>Intermediate capsid shell</i>	26
7	NSP3	85	T	<i>Translation enhancer</i>	22
8	NSP2	85	N	<i>NTPase</i>	22
9	VP7	80	G	<i>Glycolylated</i>	36
10	NSP4	85	E	<i>Enterotoxin</i>	27
11	NSP5	91	H	<i>pHosphoprotein</i>	22

Fonte: RCWG (2017) e Matthijssens *et al.* (2008a); Matthijssens *et al.* (2012) com modificações

Foi sugerida e vem sendo utilizada para as cepas de RVA um padrão de nomenclatura, seguindo as seguintes informações: RVA/espécie animal que a cepa foi detectada – origem do isolamento (wt - cepa selvagem ou tc – cultivo celular) /sigla IATA (*International Air Transport*

Association) do país/nome da amostra/ano de coleta/classificação binária em G e P (Matthijnssens *et al.*, 2011). Na ausência de uma das informações é utilizado o X no local designado a informação não disponibilizada. Nas cepas de RVA apresentadas nas figuras dessa tese, ao final da nomenclatura oficial foi também incluído o número de acesso do depósito da sequência de nucleotídeos disponível no *GenBank*.

1.3.1.1 Genotipo G

Em bovinos, os genótipos G mais predominantes em cepas de RVA são G6, G8 e G10. Entretanto, nesta espécie animal já foram descritos 12 genótipos G (G1-G3, G5, G6, G8, G10, G11, G15, G17, G21 e G24) (Papp *et al.*, 2013).

O genótipo G6 foi descrito em bovinos como o mais prevalente em todos os cinco continentes (Papp *et al.*, 2013). G10 é o segundo genótipo G mais comum em quatro (América, Ásia, Europa e Oceania) dos cinco continentes. Na África, o segundo genótipo G mais prevalente é o G8. O genótipo G6 é mais comumente encontrado em bovinos de corte e G10 em bovinos leiteiros (Dhama *et al.*, 2009).

Devido à diversidade molecular, alguns genótipos G e P podem ainda ser classificados em linhagens. O genótipo G6 é subdividido em seis linhagens (I-VI) (Tacharoenmuang *et al.*, 2015) e o G10 em dez linhagens (I-X) (Cowley *et al.*, 2013). As linhagens dos genótipos G6 e G10 estão apresentadas nas figuras 3 e 4, respectivamente.

1.3.1.2 Genotipo P

Os genótipos P mais frequentemente descritos em bovinos são P[1], P[5] e P[11], porém já existem relatos de 11 genótipos P (P[1], P[3], P[5-7], P[11], P[14], P[17], P[21], P[29] e P[33]) nessa espécie hospedeira (Papp *et al.*, 2013).

As frequências de genótipos P descritos em cepas de RVA identificadas em bovinos de quatro continentes mostram que o genótipo P[5] é o mais prevalente no mundo (25,9%), seguido por P[11] (21,5%) e P[1] (2,1%), não sendo disponíveis dados do continente africano (Papp *et al.*, 2013).

O genótipo P[5] é dividido em nove linhagens (Medeiros *et al.*, 2015) e o P[11] é dividido em seis linhagens distintas (Badaracco *et al.*, 2013), ilustradas esquematicamente nas figuras 5 e 6, respectivamente.

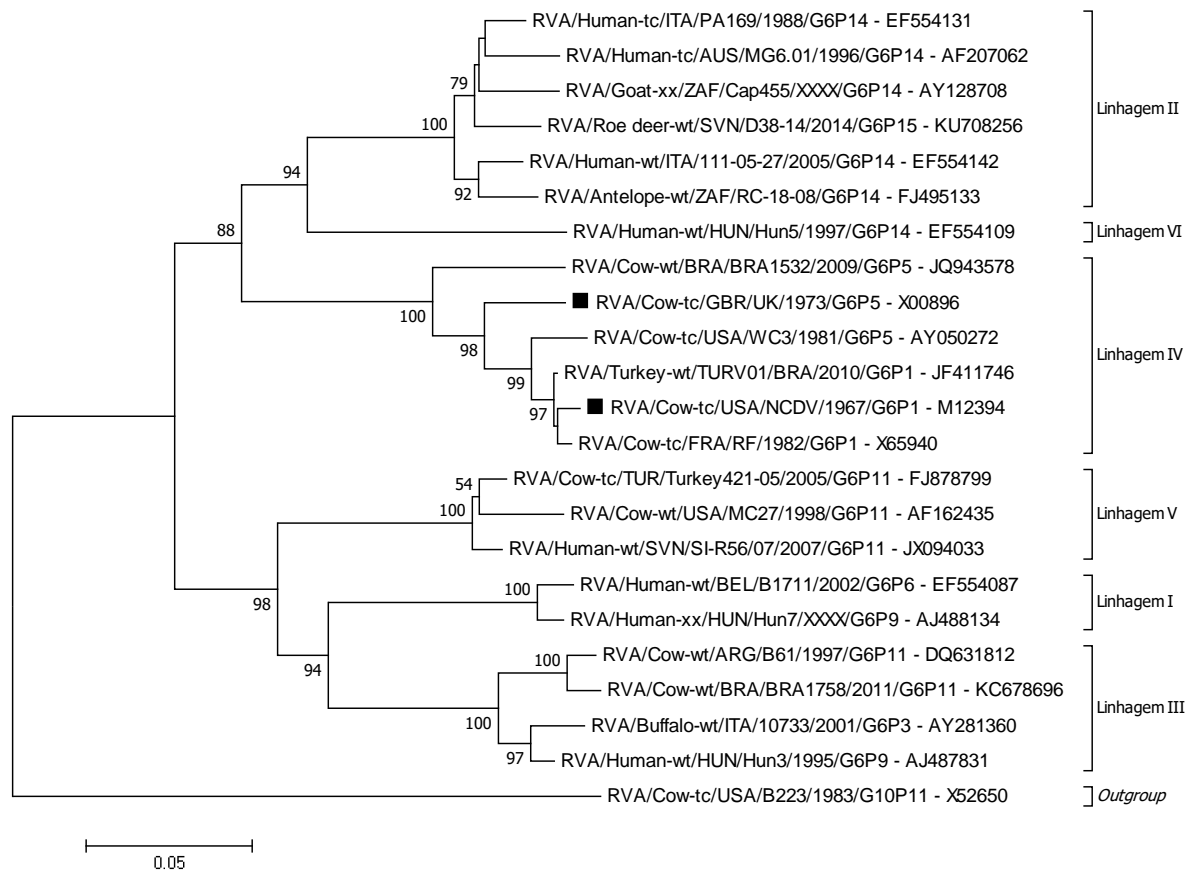


Figura 3. Árvore filogenética do gene VP7 de RVA, reconstruída utilizando 922 pb do genótipo G6 das cepas de referência disponíveis no *GenBank*, subdividida em seis linhagens. O método utilizado para a reconstrução foi *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter*. Os protótipos das vacinas, contendo G6 genótipo, disponíveis comercialmente no Brasil estão indicados por um quadrado preto. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram omitidos. A cepa de RVA B223 genótipo G10P[11], também incluída em algumas vacinas, foi utilizada como *outgroup*. O número de acesso no *GenBank* está colocado após cada nome de sequência.

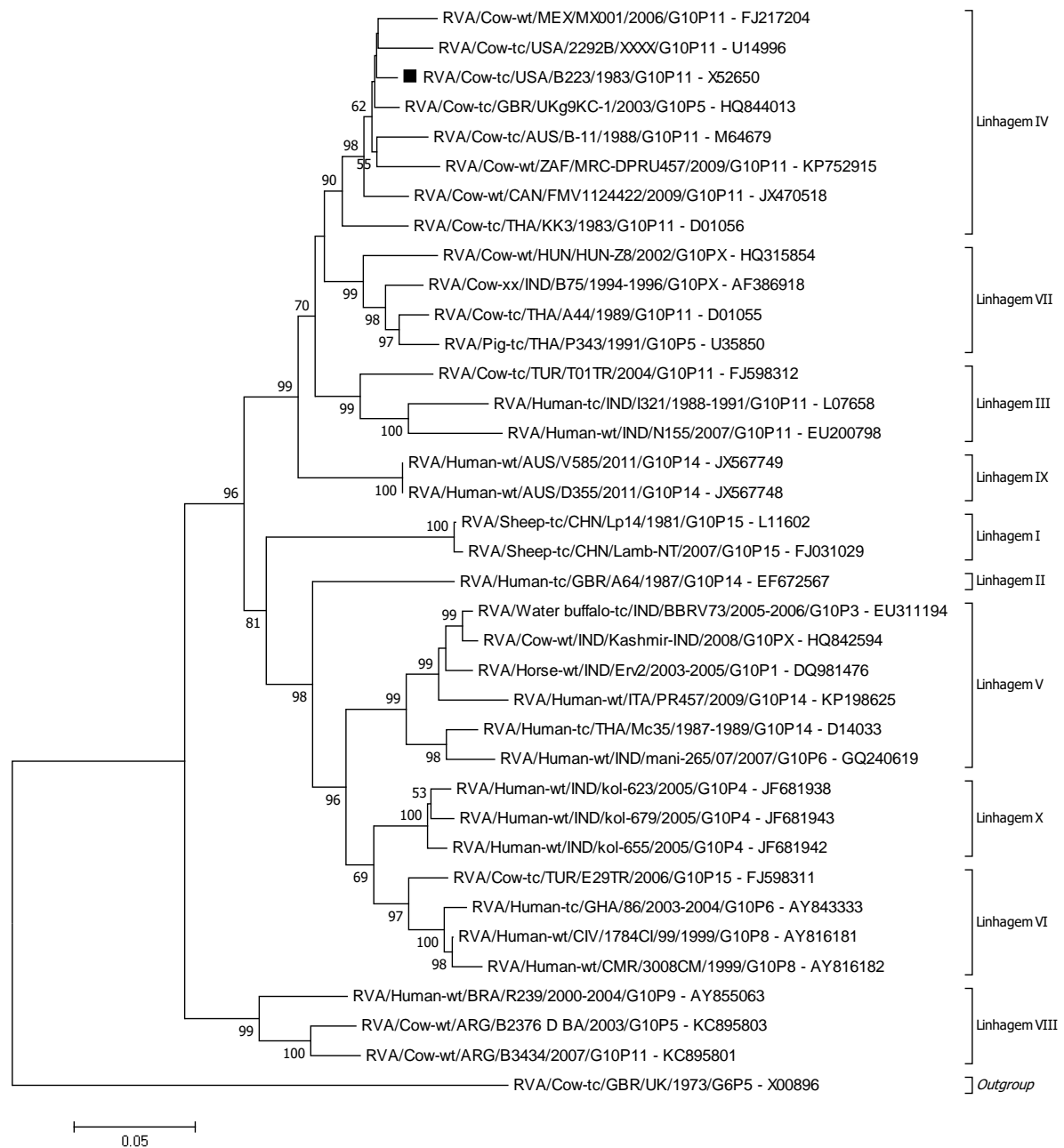


Figura 4. Árvore filogenética do gene VP7 de RVA, reconstruída utilizando 979 pb do genótipo G10 das cepas de referências disponíveis no *GenBank*, subdividida em dez linhagens. O método utilizado para a reconstrução foi *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter*. O protótipo da vacina, contendo genótipo G10, disponível comercialmente no Brasil está indicado por um quadrado preto. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram omitidos. A cepa de RVA UK genótipo G6P[5] foi utilizada como *outgroup*. O número de acesso no *GenBank* está colocado após cada nome de sequência.

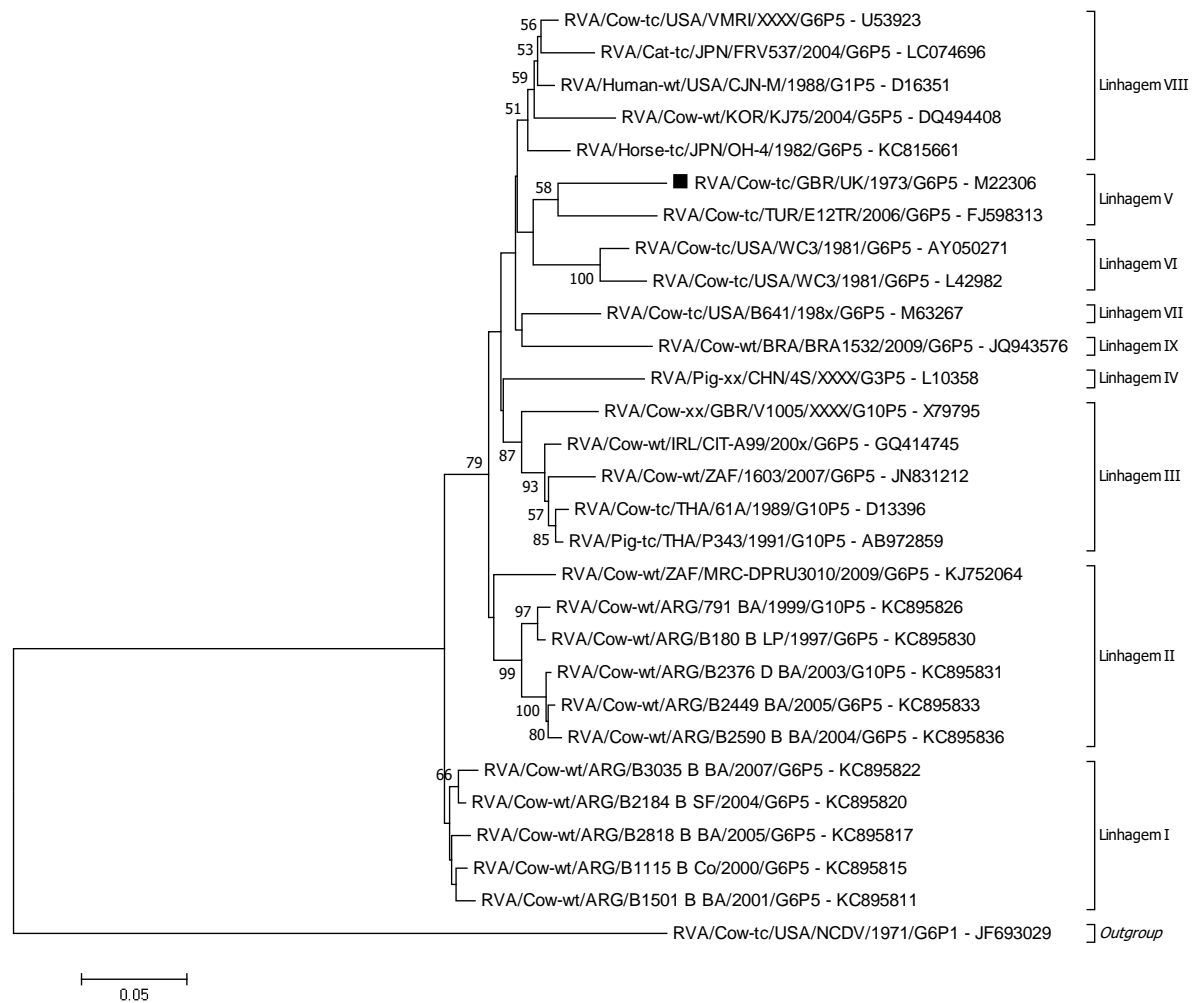


Figura 5. Árvore filogenética do gene VP4 de RVA, reconstruída utilizando 644 pb do genótipo P[5] das cepas de referências disponíveis no *GenBank*, subdividida em nove linhagens. O método utilizado para a reconstrução foi *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter*. O protótipo da vacina, contendo o genótipo P[5], disponível comercialmente no Brasil está indicado por um quadrado preto. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram omitidos. A cepa de RVA NCDV genótipo G6P[1] foi utilizada como *outgroup*. O número de acesso no *GenBank* está colocado após cada nome de sequência.

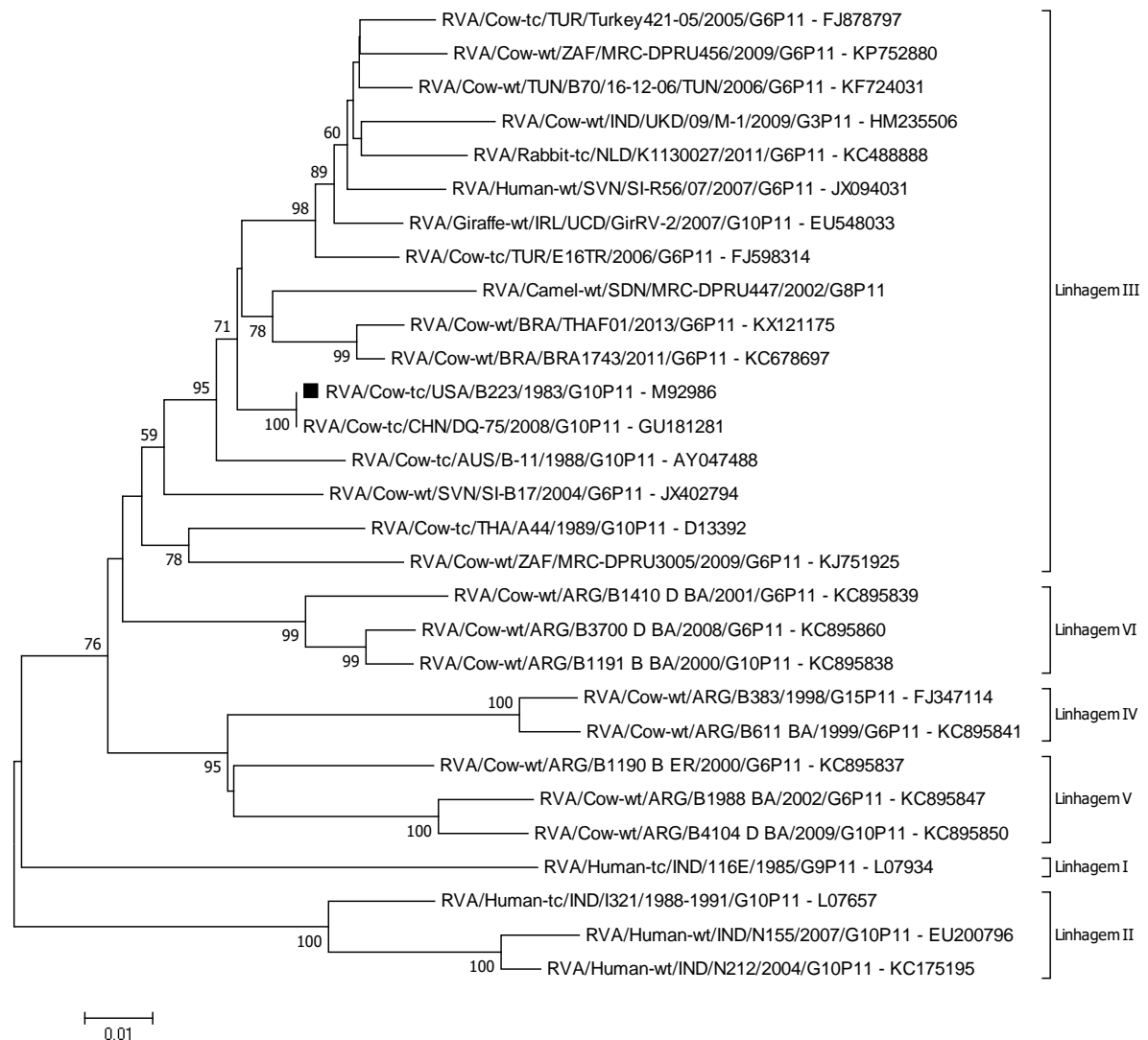


Figura 6. Árvore filogenética do gene VP4 de RVA, reconstruída utilizando 644 pb do genótipo P[11] das cepas de referências disponíveis no *GenBank*, subdividida em seis linhagens. O método utilizado para a reconstrução foi *neighbor-joining* e o modelo *Kimura two-parameter*. O protótipo da vacina, contendo o genótipo P[11], disponível comercialmente no Brasil está indicado por um quadrado preto. Os números adjacentes à árvore representam a porcentagem de *bootstrap* (1000 replicações). Valores de *bootstrap* inferiores a 50% foram omitidos. O número de acesso no *GenBank* está colocado após cada nome de sequência.

1.3.1.3 Associações de genótipo G e P

A combinação entre genótipos G e P de RVA mais descrita em bovino no mundo é G6P[5], como nos Estados Unidos (Parwani *et al.*, 1993), na Itália (Falcone *et al.*, 1999), no Japão (Fukai *et al.*, 2002; Okada e Matsumoto, 2002), na Argentina (Garaicoechea *et al.*, 2006),

na França (Kaplou *et al.*, 2013), na Austrália (Swiatek *et al.*, 2010), na Alemanha (Otto *et al.*, 2015), na Irlanda (Collins *et al.*, 2014) e na Tailândia (Pongsuwanna *et al.*, 1990). No Brasil o genótipo G6P[5] também é o mais frequente em cepas de RVA identificadas em casos clínicos de diarreia neonatal em bezerras (Alfieri *et al.*, 2004; Barreiros *et al.*, 2004; Buzinaro *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2017).

De acordo com Badaracco *et al.* (2012) o genótipo G6P[5], é o mais prevalente em cepas de RVA bovino em todo o mundo possivelmente por ser mais resistente às condições ambientais ou por circular de forma assintomática por longos períodos na população de bovinos adultos.

A combinação G10P[11], com frequência, é o segundo genótipo mais identificado em cepas de RVA bovino em países como Itália, Japão, Argentina, Turquia e Irlanda (Falcone *et al.*, 1999; Fukai *et al.*, 1999; Fukai *et al.*, 2002; Okada e Matsumoto, 2002; Garaicoechea *et al.*, 2006; Alkan *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2014) e também no Brasil (Alfieri *et al.*, 2004; Freitas *et al.*, 2011). Em estudos pontuais foi também o genótipo de RVA mais frequente na Argentina (Badaracco *et al.*, 2012), Irã (Madadgar *et al.*, 2015) e Brasil (Brito *et al.*, 2000); e na terceira posição na Itália (Monini *et al.*, 2008) e no Irã (Pourasgari *et al.*, 2016).

Caracterizada como a mais frequente associação de genótipos G e P em cepas de RVA identificadas em bovinos em alguns relatos realizados na Itália e na Turquia (Monini *et al.*, 2008; Alkan *et al.*, 2010), o genótipo G6P[11] tem sido descrito como comum em estudos realizados no Brasil em rebanhos de bovinos leiteiros (Caruzo *et al.*, 2010); em rebanhos bovinos de corte (Buzinaro *et al.*, 2009); em rebanhos mistos (Silva *et al.*, 2012); em rebanhos vacinados (Barreiros *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2017); e em um surto de diarreia neonatal em bovinos de corte comercial em sistema de criação extensiva (Medeiros *et al.*, 2014). Na Alemanha (Otto *et al.*, 2015) e na Itália (Falcone *et al.*, 1999) a combinação G6P[11] foi a segunda e terceira mais frequente, respectivamente.

1.4 PROFILAXIA

Para a prevenção efetiva da DNB causada por RVA, boas práticas de manejo associada à vacinação das vacas no período pré-parto tem sido praticada globalmente. As vacas vacinadas transferem passivamente os anticorpos específicos pelo colostro para suas bezerras para que tenham imunidade de mucosa e parenteral suficiente para prevenir a doença decorrente da infecção viral (Dhama *et al.*, 2009). Portanto, a ingestão de colostro é o principal manejo para o sucesso da imunização contra a DNB e deve ser realizada de forma adequada para que a

bezerra tenha ingestão suficiente, tanto em termos de quantidade quanto de tempo transcorrido após o nascimento (Meganck *et al.*, 2014).

O Brasil a indústria de imunobiológicos disponibiliza comercialmente quatro vacinas para a prevenção da DNB contendo RVA. Em todas as formulações o RVA é inativado. Três vacinas possuem em sua formulação as cepas protótipos G6P[1] (cepa NCDV) e G10P[11] (cepa B223) e uma possui o genótipo G6P[5] (cepa UK).

Em rebanhos bovinos brasileiros vacinados com a cepa NCDV, houve o relato da ocorrência de RVA com diferentes genótipos, alguns com o mesmo genótipo G, como G6P[5] e G6P[11], e outros com genótipos diferentes, como G8P[11], além de infecções mistas caracterizadas pela presença simultânea de cepas de RVA constituídas por genótipos distintos (Barreiros *et al.*, 2004).

Kaplon *et al.* (2013) um estudo conduzido na França com rebanhos bovinos vacinados com a cepa G6P[5] mostrou que 76,2% (16/21) das cepas de campo de RVA compartilhavam o mesmo genótipo com a cepa vacinal e os autores concluíram que a vacinação não promoveu a emergência de novos genótipos ou de variantes diferentes daqueles encontrados na vacina. Um estudo realizado na Turquia, também utilizando a vacina contendo RVA G6P[5], mostrou a ocorrência de um único genótipo G8P[5] de RVA como causa da diarreia, demonstrando falha na proteção homotípica com relação à proteína VP4 e heterotípica com relação à VP7 (Karayel *et al.*, 2017).

No México, amostras de fezes de bezerros nascidos de vacas vacinadas com RVA G6P[1] apresentaram genótipo G10P[11], sendo considerado pelos autores que a vacinação promoveu imunidade heterotípica apenas parcialmente (Rodriguez-Limas *et al.*, 2009).

No Brasil, em um rebanho de bovinos de corte regularmente vacinado com vacina contendo as cepas de RVA G6P[1] e G10P[11], foi descrito um surto de diarreia neonatal ocasionado por RVA genótipo G6P[5] (Medeiros *et al.*, 2015). Resultado semelhante foi descrito na Turquia, onde em rebanhos bovinos vacinados com as cepas G6P[1] e G6P[5] foi observada baixa proteção contra infecção por uma cepa de RVA genótipo G6, porém foi descrito com pertencente a uma linhagem distinta do genótipo G6 vacinal. Além disso as amostras possuíam na sua maioria genótipo P[11], diferente das cepas vacinais (Alkan *et al.* (2010).

Em um estudo longitudinal utilizando uma vacina com as cepas de RVA G6P[1] e G10P[11] foi descrita a ocorrência de DNB em bezerras de rebanho bovino leiteiro ocasionada por RVA genótipo G6P[11] (Rocha *et al.*, 2017). Este mesmo genótipo G6P[11] já havia sido

descrito anteriormente no Brasil em um surto de DNB em um rebanho de bovinos de corte (Medeiros *et al.*, 2014).

A pressão vacinal ocasionada pelas vacinas para RVA pode gerar competição, seleção ou variação que podem, de forma isolada ou em conjunto, serem responsáveis pela introdução ou pela emergência/reemergência de novas cepas virais, pela adaptação de cepas já existentes, ou pela introdução de diferentes genótipos (Cashman *et al.*, 2010). É amplamente reconhecido que, em condições de campo, a eficácia das vacinas contra RVA correlaciona-se com a indução de altos níveis de anticorpos neutralizantes que, por meio do colostro ou, com menor frequência, pelo leite de vacas vacinadas, atuam sobre os vírus de campo presentes em bezerros recém-nascidos, mas que foram passivamente imunizados. Segundo Falcone *et al.* (1999), uma resposta imune homotípica máxima ocorre apenas contra os genótipos presentes na vacina, enquanto títulos mais baixos de anticorpos neutralizantes são induzidos contra cepas de RVA com diferentes G e P genótipos. Sendo assim, quanto maior o grau de homologia dos sorótipos/genótipos G e P que uma cepa vacinal compartilha com os vírus selvagens, maior a probabilidade de eficácia da vacina no campo.

Em todo o mundo a diarreia neonatal é o evento sanitário mais importante na criação de bezerras e RVA é a principal etiologia viral. Entre algumas medidas sanitárias importantes para mitigar o risco da ocorrência de surtos de diarreia neonatal, a vacinação das vacas destaca-se como uma das mais importantes. Vários estudos demonstram que a vacinação não elimina os riscos de infecção, porém, sem dúvida, reduz tanto a frequência quanto a intensidade dos episódios de diarreia neonatal ocasionada por RVA. Considerando que a pressão imune dirigida pela vacinação rotineira pode ter o potencial de selecionar a presença de alguns genótipos G e P específicos, ressalta-se a importância do monitoramento epidemiológico dos genótipos presentes nas cepas de RVA de campo circulantes em rebanhos bovinos.

Referências

- ABUELO, A. Investigation of an outbreak of neonatal calf diarrhoea in a dairy herd. **Veterinary Record Case Reports**, v. 4, n. 2, 2016.
- AL MAWLY, J. et al. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 2, p. 155-60, Feb 2015.
- ALFIERI, A. A. Gestão profilática das principais doenças infecto-contagiosas em bovinos leiteiros. In: (Ed.). **Bovinocultura de leite: Inovação Tecnológica e Sustentabilidade**. 1ª ed. Maringá/PR: Editora da Universidade Estadual de Maringá, v.1, 2008. cap. 131-152,
- ALFIERI, A. A. et al. 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, Oct-Nov 2006.
- ALFIERI, A. F. et al. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, v. 99, n. 3-4, p. 167-73, Apr 19 2004.
- ALKAN, F. et al. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 3-4, p. 231-7, Mar 24 2010.
- ASANO, K. M. et al. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 169, n. 2, p. 375-9, Nov 2010.
- BADARACCO, A. et al. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. **Veterinary Microbiology**, v. 158, n. 3-4, p. 394-9, Aug 17 2012.
- BANYAI, K. et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 19-26, Mar 2017.

BARREIROS, M. A. et al. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. **Journal of Veterinary Medicine.**, v. 51, n. 3, p. 104-9, Apr 2004.

BARRY, A. F. et al. Bovine coronavirus detection in a collection of diarrheic stool samples positive for group a bovine rotavirus. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 45-49, 2009.

BARTELS, C. J. et al. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 2-3, p. 162-9, Feb 1 2010.

BRITO, W. M. E. D. D. et al. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 140-145, 2000.

BUZINARO, M. G. et al. Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 266-270, 2003.

BUZINARO, M. G. et al. Ocorrência dos Genótipos G e P de Rotavirus do grupo A em Bezerros de Rebanhos de Corte no Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 1, p. 99-105, 2009.

CARUZO, T. A. et al. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1040-3, Dec 2010.

CASHMAN, O. et al. Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 3-4, p. 238-44, Dec 15 2010.

CHO, Y. I.; YOON, K. J. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, n. 1, p. 1-17, 2014.

COLLINS, P. J. et al. Detection and characterisation of bovine rotavirus in Ireland from 2006-2008. **Irish Veterinary Journal**, v. 67, n. 1, p. 13, 2014.

COURA, F. M. et al. Longitudinal study of Salmonella spp., diarrheagenic Escherichia coli, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 1, p. 3-11, Jan 2015.

COWLEY, D. et al. Novel G10P[14] rotavirus strain, northern territory, Australia. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 19, n. 8, p. 1324-7, Aug 2013.

DHAMA, K. et al. Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 1, p. 1-23, Jan 2009.

DUREL, L. et al. Immune response of mature cows subjected to annual booster vaccination against neonatal calf diarrhoea with two different commercial vaccines: A non-inferiority study. **Livestock Science**, v. 204, p. 52-58, 2017/10/01/ 2017.

FALCONE, E. et al. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3879-82, Dec 1999.

FAO. **Livestock Primary**: Food and Agriculture Organization of the United Nations 2017.

FREITAS, P. P. S. et al. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p. 820-827, 2011.

FUKAI, K. et al. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 343-349, 2002/05/24/ 2002.

FUKAI, K. et al. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. **Veterinary Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 301-11, May 1999.

GARAICOECHEA, L. et al. Molecular characterization of bovine rotavirus circulating in beef and dairy herds in Argentina during a 10-year period (1994-2003). **Veterinary Microbiology**, v. 118, n. 1-2, p. 1-11, Nov 26 2006.

GHOSH, S. et al. Evidence for interstate transmission and increase in prevalence of bovine group B rotavirus strains with a novel VP7 genotype among diarrhoeic calves in Eastern and Northern states of India. **Epidemiology and Infection**, v. 135, n. 8, p. 1324-30, Nov 2007.

GREENBERG, H. B.; ESTES, M. K. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. **Gastroenterology**, v. 136, n. 6, p. 1939-51, May 2009.

IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2016. v. 44, 2017.

ICTV. **International Committee on Taxonomy of Viruses** 2017.

IZZO, M. M. et al. Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 5, p. 167-73, May 2011.

KAPLON, J. et al. Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. **Vaccine**, v. 31, n. 20, p. 2433-40, May 7 2013.

KARAYEL, I. et al. Putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic rotavirus infection in newborn calves, Turkey, 2015. **Veterinary Microbiology**, v. 201, p. 7-13, Mar 2017.

LANGONI, H. et al. Considerações sobre o tratamento das mastites. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, p. 1261-1269, 2017.

MADADGAR, O. et al. Genotyping and determining the distribution of prevalent G and P types of group A bovine rotaviruses between 2010 and 2012 in Iran. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 3-4, p. 190-6, Sep 30 2015.

MARTELLA, V. et al. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. **Virology**, v. 346, n. 2, p. 301-11, Mar 15 2006.

MATSUDA, Y. et al. Two-way cross-neutralization mediated by a shared P (VP4) serotype between bovine rotavirus strains with distinct G (VP7) serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 354-8, Feb 1993.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3204-19, Apr 2008a.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, v. 156, n. 8, p. 1397-413, Aug 2011.

MATTHIJNSSENS, J. et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v. 153, n. 8, p. 1621-9, 2008b.

MATTHIJNSSENS, J. et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v. 157, n. 6, p. 1177-82, Jun 2012.

MEBUS, C. A. et al. Further studies on neonatal calf diarrhea virus. **Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc**, v. 73, p. 97-9, 1969.

MEDEIROS, T. N. S. et al. Severe diarrhea outbreak in beef calves (*Bos indicus*) caused by G6P[11], an emergent genotype of bovine rotavirus group A. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 717-722, 2014.

MEDEIROS, T. N. S. et al. Phylogenetic analysis of a G6P[5] bovine rotavirus strain isolated in a neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd vaccinated with G6P[1] and G10P[11] genotypes. **Archives of Virology**, v. 160, n. 2, p. 447-51, Feb 2015.

MEGANCK, V.; HOFACK, G.; OPSOMER, G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, p. 75, Nov 25 2014.

MONINI, M. et al. Molecular characterization of bovine rotavirus strains circulating in northern Italy, 2003–2005. **Veterinary Microbiology**, v. 129, n. 3, p. 384-389, 2008/06/22/2008.

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

OTTO, P. H. et al. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 3-4, p. 168-76, Sep 30 2015.

PAPP, H. et al. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 3-4, p. 190-9, Aug 30 2013.

PARRENO, V. et al. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 100, n. 1-2, p. 7-24, Jul 2004.

PARWANI, A. V. et al. Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G and P type-specific cDNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 8, p. 2010-5, Aug 1993.

PONGSUWANNA, Y. et al. Serological and genetic characterization of bovine rotaviruses in Thailand by ELISA and RNA-RNA hybridization: detection of numerous non-serotype 6 strains. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 21, n. 4, p. 607-13, Dec 1990.

POURASGARI, F. et al. The molecular epidemiology of bovine rotaviruses circulating in Iran: a two-year study. **Archives of Virology**, v. 161, n. 12, p. 3483-3494, Dec 2016.

RCWG. Rotavirus Classification Working Group. Newly assigned genotypes - June 30th 2017. 2017. Disponível em: < <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg> >. Acesso em: February 10th 2018.

ROCHA, T. G. et al. Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. **Tropical Animal Health and Production**, v. 49, n. 4, p. 783-790, Apr 2017.

RODRIGUEZ-LIMAS, W. A. et al. Genotypification of bovine group A rotavirus in Mexico. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6411-4, Oct 30 2009.

SILVA, F. D. F. et al. Molecular characterization of group A bovine rotavirus in southeastern and central-western Brazil, 2009-2010. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 237-242, 2012.

SILVEIRA, J. A. S. et al. Afecções podais em vacas da bacia leiteira de Rondon do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 905-909, 2009.

SWIATEK, D. L. et al. Detection and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Australian calves during 2004 and 2005. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 1-2, p. 56-62, Jan 6 2010.

TACHAROENMUANG, R. et al. Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events. **PLoS One**, v. 10, n. 9, p. e0139381, 2015.

UETAKE, K. Newborn calf welfare: a review focusing on mortality rates. **Animal Science Journal**, v. 84, n. 2, p. 101-5, Feb 2013.

USONIS, V. et al. The unpredictable diversity of co-circulating rotavirus types in Europe and the possible impact of universal mass vaccination programmes on rotavirus genotype incidence. **Vaccine**, v. 30, n. 31, p. 4596-605, Jun 29 2012.

VAN ZAANE, D.; IJZERMAN, J.; DE LEEUW, P. W. Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrum with or without rotavirus antibody. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 11, n. 1, p. 45-63, Jan 1986.

WINDEYER, M. C. et al. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 113, n. 2, p. 231-40, Feb 1 2014.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Monitorar os genótipos G (VP7) e P (VP4) de cepas de RVA identificadas em bezerras com diarreia neonatal em rebanhos bovinos leiteiros regularmente vacinados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Por meio de um estudo longitudinal avaliar a frequência de diarreia, a frequência de RVA e os genótipos G e P presentes nas cepas de RVA circulantes em bezerras com idade inferior a 30 dias provenientes de um rebanho bovino leiteiro vacinado com genótipo G6P[5] (cepa UK);
- Por meio de um estudo transversal avaliar a frequência de diarreia, a frequência de RVA e os genótipos G e P presentes nas cepas de RVA circulantes em bezerras com idade inferior a 30 dias provenientes de 14 rebanhos bovinos leiteiros vacinados com genótipo G6P[5] (cepa UK).

3.1. Longitudinal surveillance of rotavirus A genotypes circulating in a high milk yield dairy cattle herd post-rotavirus vaccine introduction

Artigo redigido de acordo com as normas do periódico *Vaccine*

Disponível em <https://www.journals.elsevier.com/vaccine>

Longitudinal surveillance of rotavirus A genotypes circulating in a high milk yield dairy cattle herd post-rotavirus vaccine introduction

Abstract

Worldwide neonatal diarrhea is the most important health event in dairy calves rearing and rotavirus A (RVA) is the main viral etiology. Among some important health measures to mitigate the risk of neonatal diarrhea outbreaks, the cows vaccination stands out as one of the most important. Considering that the immune pressure induced by routine vaccination may have the potential to select the presence of some specific G and P genotypes of RVA this study aimed to determine frequency of neonatal diarrhea, the incidence of RVA, and to monitor the G and P genotypes present in the RVA field strains circulating in a high milk yield cattle herd vaccinated with RVA G6P[5] genotype. Fecal samples ($n=1,220$) from 122 Holstein heifer calves up to 30-day-old born from RVA vaccinated cows were collected in 10 different ages (1, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, and 30-days-old) regardless of the presence or absence of diarrhea. At the time of collection, according to fecal consistency the fecal samples were classified by score: 0 (normal), 1 (pasty), 2 (soft), and 3 (watery). The presence of RVA dsRNA in fecal samples was determined by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique confirmed by RT-PCR to G and P genotype. G and P RT-PCR amplicons of 10 RVA positive fecal samples identified in different calves of different ages were submitted to nucleotide sequencing. The rates of calves and fecal samples positive for RVA were 62.3% (76/122) and 8.1% (99/1,220), respectively. By sequence analysis, all the 10 RVA field strains were characterized as genotype G10P[11]. In summary, besides the low frequency and severity of neonatal diarrhea observed in calves born from RVA G6P[5] vaccinated cows, in this study was possible to identify that the G and P genotypes of wild-type circulating RVA strains (G10P[11]) were different from those present in the vaccine used for neonatal diarrhea control. Nevertheless, complementary analyses are required for better understanding of the influence of vaccination on RVA strains circulating in RVA vaccinated cattle herds.

Keywords: Calf, neonatal diarrhea, vaccine, RVA, genotype.

Introduction

Neonatal calf diarrhea (NCD) is the most common cause of calf morbidity and mortality which can exceed 20% in some instances [1]. The etiology of this syndrome involves nutritional and sanitary management, immunological aspects, and infectious agents, as bacteria, viruses, and protozoa [2]. Bovine rotavirus A (RVA) is the most prevalent viral agent associated with in NCD in dairy and beef cattle herds worldwide [2, 3].

The non-enveloped virion of RVA is composed by a triple-layered capsid surrounding 11 dsRNA segments that encode 6 structural (VP1–VP4, VP6, and VP7) and 6 nonstructural (NSP1-NSP5/6) proteins [4]. Based on antigenic characteristics and sequence analyses of VP6 gene *Rotavirus* genus is primarily classified into nine distinct groups/species (A-I) [5-7], and a new proposal species J was described in bat [8]. The VP7 and VP4 genes encode two structural proteins responsible to induce the immune protective response and are used for binary classification of the RVA strains in G and P genotypes, respectively. Currently, 36 G and 51 P genotypes are recognized by Rotavirus Classification Working Group [9].

Calves with 1 to 3 weeks old have a window of opportunity for infection by microorganisms and consequently occurrence of disease, this event occurs because the antibody from passive immunity decrease to a level still high enough to block responses to the vaccine but not high enough to resist a field infection [10]. So, the implantation of cow vaccination program is an important strategy to protect the calves from RVA infection and neonatal diarrhea.

The commercial vaccines available in Brazil contain inactivated RVA and other infectious agents involved in NCD. One of these has the G6P[5] genotype, that is the more prevalent RVA genotype described worldwide [11] and also in Brazil [12].

The aim of this study was to determine the frequency and intensity of neonatal diarrhea, the incidence of RVA, and evaluate the RVA G and P genotypes circulating in dairy calves born from cows regularly vaccinated with RVA G6P[5] strain in a high milk yield dairy cattle herd.

Materials and Methods

Herd information

The dairy farm is located in the city of Descalvado, São Paulo State, Brazil (21° 54' 14" S, 47° 37' 10" W) and is operated as a closed dairy cattle herd with 1,800 Holstein cows in lactation. The cows were managed on free stall system and with appropriate nutritional and health practices. This high milk yield dairy cattle herd produces an average of 37 liters/day/cow.

The calves are reared in individual pens on elevated floors. The colostrum intake was accompanied to be consumed in adequate time and quantity for all newborn calves.

Cows vaccination

Sixty or 45 days before calving the cows were vaccinated against NCD. The commercial vaccine contains in the formulation inactivated bovine rotavirus (UK-Compton strain - G6P[5]), inactivated bovine coronavirus (Mebus strain), and *E. coli* (K99) adesine F5. The vaccination was performed according to manufacturer's instruction.

Fecal samples

Fecal samples from 122 heifer calves born from RVA-vaccinated cows were collected in 10 different ages (1, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, and 30 days old) regardless of the presence or absence of diarrhea. The sampling was collected between March and May 2017, totalizing 1,220 fecal samples that were stored at -20°C until analysis. At the time of collection all fecal samples were classified according the score of fecal consistency in: 0 (normal); 1 (pasty); 2 (soft); and 3 (watery). The scores 0 and 1 were considered non-diarrheic and 2 and 3 were diarrheic fecal samples.

Evaluation of RVA presence

In the analysis of 10 fecal samples from the same animal, collected in different days old, were processed at the same time to avoid any bias. The dsRNA extraction was performed with a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate extraction methods according to Alfieri et al. [13]. The presence of RVA dsRNA in fecal samples was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique [14], followed by silver staining [15].

RVA genotyping

Fecal samples positive for RVA in PAGE from different collections, date, and calves ages were confirmed by RT-PCR assay using consensus primers to amplify 1,062 bp of the VP7 gene [16] and 876 bp of the VP4 (VP8*) gene [17, 18]. The RT-PCR products were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels with ethidium bromide and observed under ultraviolet light. Ten RT-PCR products with better quality from RVA-positive fecal samples from 10 calves of different age groups were selected for sequence analysis.

The RT-PCR products were purified using an Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE[®], Buckinghamshire, UK), quantified using Qubit[®] Fluorometer (Invitrogen[®] Life Technologies, Eugene, OR, USA), and sequenced using an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA) with the same primers used in RT-PCR. Software Phred and CAP3 were used to obtain nucleotide (nt) quality analysis and contig assembly of the RVA sequences, respectively (asparagin.cenargen.embrapa.br). Sequence similarity searches were performed using the basic local alignment search tool (BLAST) software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). BioEdit software version 7.0.8.0 was used for the construction of the nt sequence identity matrix. The nt sequence data presented in this study have been deposited in the GenBank database (accession numbers MH016179 and MH016180).

Results and Discussion

Seventy-six (62.3%) of the 122 heifer calves were RVA-positive in at least one of the 10 fecal samples evaluated. Worldwide the percentage of calves RVA positive varies in several studies according to the experimental design. In England [19] and New Zealand [3] were reported rates of 45.9 (161/351) and 20.0% (246/1,226) of RVA positive dairy calves, respectively. In Brazil, Coura et al. [2] also in a longitudinal study reported that 49.2% (33/67) of dairy heifer calves up to 30-day-old excreted RVA at some point. However, in a transversal study also done in Brazil 138 of 683 (20.2%) dairy calves up to 30-day-old were RVA positive [13].

The percentage of RVA positive fecal samples in this study was 8.1% (99/1,220) being that 19 (15.6%) calves excreted RVA for more than one occasion. Other longitudinal studies performed to determine the RVA infection in calves born from vaccinated dairy cows conducted in Brazil the rates of RVA-positive diarrheic fecal samples were 5.7% (49/850) [2] and 3.9% (11/281) [20].

The distribution of the total sampling and the number of RVA positive fecal samples by fecal consistency scores and the age of the calf at the time of sample collection are shown in table 1. Evaluating the number of fecal collections ($n=10$) performed in calves up to 30-day-old and the fecal consistency score, we can consider that during the experiment the frequency of diarrheic calves was not high. Fecal samples with scores 0 and 1 ($n=863$) represented 70.7% of the total sampling, while samples with scores 2 and 3, indicating diarrhea, comprised only 17.0 ($n=208$) and 12.2% ($n=149$) respectively. Recently, in a similar study conducted in Brazil with RVA-unvaccinated dairy cattle herds the frequency of diarrheic fecal samples constituting the total sampling was higher than that found in this experiment [2].

Table 1. Distribution of the total sampling and the number of rotavirus A positive fecal samples by fecal consistency scores and the age of the calf at the time of sample collection from heifer calves born from a rotavirus vaccinated high milk yield dairy cattle herd, Brazil, 2017.

Age/ Days	Fecal Samples (<i>n</i>)*	Score				Total (%)
		0 (normal)	1 (pasty)	2 (soft)	3 (watery)	
1	N	23	44	32	23	
	+	–	–	–	–	–
4	N	25	74	16	7	
	+	–	1	–	–	1 (0.8)
7	N	39	73	7	3	
	+	3	4	–	–	7 (5.7)
10	N	40	55	16	11	
	+	3	3	6	2	14 (11.5)
14	N	31	36	26	29	
	+	6	4	3	6	19 (15.6)
17	N	19	35	38	30	
	+	2	3	7	10	22 (18.0)
21	N	33	40	21	28	
	+	4	2	3	2	11 (9.0)
24	N	45	47	18	12	
	+	3	1	5	1	10 (8.2)
28	N	46	52	21	3	
	+	2	3	2	1	8 (6.6)
30	N	49	57	13	3	
	+	3	4	–	–	7 (5.7)
Total	N	350	513	208	149	1,220
	+ (%)	26 (7.43)	25 (4.87)	26 (12.50)	22 (14.76)	99 (8.11)

*(**n**) total number of fecal samples and (+) number of RVA-positive samples

Studies have indicated that the RVA infection in diarrheic calves is significantly higher to that found in non-diarrheic feces [3, 21, 22]. In this study, 13,44% of the diarrheic fecal samples were RVA positive. On average, the frequency of RVA-positive samples in diarrheic feces of calves worldwide ranges between 5.5 and 57.9% [13, 21, 23-30]. In this study, dsRNA of RVA was identified in 5.9% (51/863) of fecal samples with score 0 and 1 and in 12.5% (26/208) and 14.8% (22/149) of diarrheic samples, score 2 and 3, respectively. Although more frequent

in diarrheic calves, the frequency of RVA diagnosis was lower than that observed in unvaccinated herds [20].

The distribution of fecal sampling according to the age of calves in weeks-old shows that the first and fourth weeks the frequency of diagnosis of RVA was 2.2% (8/366) and 6.8% (25/366), respectively. However, in the second and third weeks the frequency of RVA-positive fecal samples was higher with the two weeks reaching the rate of 13.5%. It suggests a decrease in passive immunity, corroborating with studies describing that the passive immunity protect calves until one week and the natural resistance has been initiated just after four weeks of age [13], and high susceptibility of the animals with these ages. Meganck et al. [31] and Coura et al. [2] described that diarrhea caused by RVA is most frequent in 1 to 3-week-old calves, and Alfieri et al. [13] suggested that animals from dairy cattle herds were most susceptible to RVA infection with 2- and 3-week-old.

As for control of neonatal diarrhea the farm uses the cow vaccination with commercial vaccine with RVA UK-Compton strain genotype G6P[5] in order to determine the G and P genotypes of RVA field strains identified in this study we selected 10 RVA-positive fecal samples from 10 calves of different age groups for nucleotide (nt) sequence analysis of VP7 and VP4 amplicons. The analysis allowed to identify the genotype G10P[11] in all wild-type RVA strains with high (99.3 to 100%) nt similarity between them.

The G10 and P[11] genotypes are not included in the RVA vaccine used in the dairy farm evaluated in this study. The VP7 gene of the RVA Brazilian strains showed the highest (93.7%) nt identity with American bovine strain 2292B (GenBank accession number: U14996) that belongs to G10 lineage IV and VP4 gene (95.3%) with prototype B223 strain (GenBank accession number: D13394) of P[11] lineage III, respectively.

A putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic RVA infection in newborn calves was described in Turkey where the emergence of RVA strains genotype G8P[5] was reported in a cattle herd vaccinated with G6P[5] RVA strain characterizing failure in heterologous protection [32]. The occurrence of emerging heterologous RVA genotypes is an effect described in Brazilian dairy and beef cattle herds post rotavirus vaccine introduction [20, 33]. A similar event has also been described in humans in Brazil and in other countries around the world [34-38].

However, depending on some factors such as the type of cattle (beef or dairy), type of cow and calf management (intensive or extensive), and the health programs with or without vaccination for neonatal diarrhea control discordant results between experiments can be found. In France, Kaplon et al. (2013) evaluated beef cattle herds in extensive management and found

no difference between the frequencies of diarrhea and RVA-positive fecal samples identified in vaccinated and unvaccinated herds. The most of the genotyped RVA-positive diarrheic fecal samples presented the same genotype profile (G6P[5]) of the vaccine strain.

Among some important health measures to mitigate the risk of neonatal diarrhea outbreaks, the cows vaccination stands out as one of the most important. Several studies demonstrate that vaccination does not eliminate the risks of infection but certainly reduces both the frequency and severity of neonatal diarrhea episodes in calves caused by RVA infection. Considering that the immune pressure directed by routine vaccination may have the potential to select the presence of some specific G and P genotypes, it is also important to monitor the genotypes present in the RVA field strains circulating in vaccinated cattle herds.

In summary, besides the low occurrence of neonatal diarrhea in calves born from RVA G6P[5] vaccinated cows, in this study was possible to identify the G10P[11] genotype, different from those present in the vaccine strain, circulating in wild-type RVA strains.

References

- [1] Uetake K. Newborn calf welfare: a review focusing on mortality rates. *Animal Science Journal*. 2013;84:101-5.
- [2] Coura FM, Freitas MD, Ribeiro J, de Leme RA, de Souza C, Alfieri AA, et al. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Tropical Animal Health and Production*. 2015;47:3-11.
- [3] Al Mawly J, Grinberg A, Prattley D, Moffat J, Marshall J, French N. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *The Veterinary Journal*. 2015;203:155-60.
- [4] Greenberg HB, Estes MK. Rotaviruses: from pathogenesis to vaccination. *Gastroenterology*. 2009;136:1939-51.
- [5] Matthijnssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, Van Ranst M, Johne R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology*. 2012;157:1177-82.
- [6] Mihalov-Kovacs E, Gellert A, Marton S, Farkas SL, Feher E, Oldal M, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 2015;21:660-3.
- [7] ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. 2017.

- [8] Banyai K, Kemenesi G, Budinski I, Foldes F, Zana B, Marton S, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2017;48:19-26.
- [9] RCWG. Rotavirus Classification Working Group. Newly assigned genotypes - June 30th 2017. 2017.
- [10] Chase CC, Hurley DJ, Reber AJ. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2008;24:87-104.
- [11] Papp H, Laszlo B, Jakab F, Ganesh B, De Grazia S, Matthijssens J, et al. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Veterinary Microbiology*. 2013;165:190-9.
- [12] Medeiros TNS. Bovine neonatal diarrhea: epidemiology and molecular characterization of G (VP7) and P (VP4) genotypes of rotavirus A, Brazil, 2006-2015.: Universidade Estadual de Londrina; 2016.
- [13] Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Medici KC, Alfieri AF. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Tropical Animal Health and Production*. 2006;38:521-6.
- [14] Pereira HG, Azeredo RS, Leite JP, Candeias JA, Racz ML, Linhares AC, et al. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, Sao Paulo and Para, Brazil. *The Journal of Hygiene*. 1983;90:117-25.
- [15] Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*. 1982;16:473-7.
- [16] Gouvea V, Glass RI, Woods P, Taniguchi K, Clark HF, Forrester B, et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 1990;28:276-82.
- [17] Martella V, Ciarlet M, Banyai K, Lorusso E, Cavalli A, Corrente M, et al. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology*. 2006;346:301-11.
- [18] Gentsch JR, Glass RI, Woods P, Gouvea V, Gorziglia M, Flores J, et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;30:1365-73.
- [19] Snodgrass DR, Terzolo HR, Sherwood D, Campbell I, Menzies JD, Synge BA. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet Rec*. 1986;119:31-4.

- [20] Rocha TG, Silva FD, Gregori F, Alfieri AA, Buzinaro MD, Fagliari JJ. Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. *Tropical Animal Health and Production*. 2017;49:783-90.
- [21] Chitambar SD, Arora R, Kolpe AB, Yadav MM, Raut CG. Molecular characterization of unusual bovine group A rotavirus G8P[14] strains identified in western India: emergence of P[14] genotype. *Veterinary Microbiology*. 2011;148:384-8.
- [22] Bartels CJ, Holzhauser M, Jorritsma R, Swart WA, Lam TJ. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*. 2010;93:162-9.
- [23] Caruzo TA, Brito WM, Munford V, Racz ML. Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2010;105:1040-3.
- [24] Malik YS, Sharma K, Vaid N, Chakravarti S, Chandrashekar KM, Basera SS, et al. Frequency of group A rotavirus with mixed G and P genotypes in bovines: predominance of G3 genotype and its emergence in combination with G8/G10 types. *Journal of Veterinary Science*. 2012;13:271-8.
- [25] Silva FDF, Gregori F, Gonçalves ACS, Samara SI, Buzinaro MG. Molecular characterization of group A bovine rotavirus in southeastern and central-western Brazil, 2009-2010. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012;32:237-42.
- [26] Barreiros MA, Alfieri AF, Medici KC, Leite JP, Alfieri AA. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. *Journal of Veterinary Medicine*. 2004;51:104-9.
- [27] Brito WMEDd, Munford V, Villaça AM, Caruzo TAR, Rác M-L. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2000;31:140-5.
- [28] Buzinaro MG, Samara SI, Pereira EAS, Fuentes DB, Oliveira MCS. Ocorrência dos Genótipos G e P de Rotavirus do grupo A em Bezerros de Rebanhos de Corte no Estado de São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2009;76:99-105.
- [29] Badaracco A, Garaicoechea L, Rodriguez D, Uriarte EL, Odeon A, Bilbao G, et al. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Veterinary Microbiology*. 2012;158:394-9.
- [30] Falcone E, Tarantino M, Di Trani L, Cordioli P, Lavazza A, Tollis M. Determination of bovine rotavirus G and P serotypes in Italy by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37:3879-82.

- [31] Meganck V, Hoflack G, Opsomer G. Advances in prevention and therapy of neonatal dairy calf diarrhoea: a systematical review with emphasis on colostrum management and fluid therapy. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 2014;56:75.
- [32] Karayel I, Feher E, Marton S, Coskun N, Banyai K, Alkan F. Putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic rotavirus infection in newborn calves, Turkey, 2015. *Veterinary Microbiology*. 2017;201:7-13.
- [33] Medeiros TNS, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA. Phylogenetic analysis of a G6P[5] bovine rotavirus strain isolated in a neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd vaccinated with G6P[1] and G10P[11] genotypes. *Archives of Virology*. 2015;160:447-51.
- [34] Santos VS, Nobrega FA, Soares MWS, Moreira RD, Cuevas LE, Gurgel RQ. Rotavirus Genotypes Circulating in Brazil Before and After the National Rotavirus Vaccine Program: A Review. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2018;37:e63-e5.
- [35] Cowley D, Donato CM, Roczo-Farkas S, Kirkwood CD. Novel G10P[14] rotavirus strain, northern territory, Australia. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 2013;19:1324-7.
- [36] Khandoker N, Thongprachum A, Takanashi S, Okitsu S, Nishimura S, Kikuta H, et al. Molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis in Japan during 2014-2015: characterization of re-emerging G2P[4] after rotavirus vaccine introduction. *Journal of Medical Virology*. 2018.
- [37] Doro R, Laszlo B, Martella V, Leshem E, Gentsch J, Parashar U, et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;28:446-61.
- [38] Banyai K, Laszlo B, Duque J, Steele AD, Nelson EA, Gentsch JR, et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 1:A122-30.

**3.2. Cross-sectional study of G and P genotypes of rotavirus A field strains circulating in
regularly vaccinated dairy cattle herds**

Artigo redigido de acordo com as normas do periódico *Journal of Dairy Science*
disponível em <http://www.journalofdairyscience.org/>

Cross-sectional study of G and P genotypes of rotavirus A field strains circulating in regularly vaccinated dairy cattle herds

Abstract

Neonatal diarrhea is the main cause of morbidity and mortality in calves up to 30-day-old and rotavirus A (RVA) is the main viral etiology of this important sanitary event in beef and dairy cattle herds worldwide. RVA vaccines are one of the main tools for diarrhea control in neonates. However, RVA has a complex antigenic and molecular diversity and the constant tracking of the RVA field strains is relevant for epidemiological monitoring of the emergence of new viral variants. The aim of this cross-sectional study was to monitor the G and P genotypes of RVA field strains identified in dairy cattle herds regularly vaccinated with RVA UK strain (G6P[5]). The dairy cattle herds, located in the south region of Minas Gerais state, southeastern Brazil, were randomly selected. The diagnosis of RVA was performed by RT-PCR assay to VP7 and VP4 genes detection. Of the 14 selected herds, two were removed since on the day of fecal collection no calf was diagnosed with diarrhea. Another six herds were also removed from the study because all 20 diarrheic fecal samples evaluated were RT-PCR negative for RVA. In the remaining six herds 17 (25.4%) of 67 diarrheic fecal samples evaluated were RVA-positive. One RVA RT-PCR amplicon with best quality of each herd was selected for nucleotide sequencing and G and P genotypes determination in circulating RVA strains. In the phylogenetic analysis, five RVA field strains showed G6P[11] and one G10P[11] genotypes. The G6 genotype present in all RVA field strains cluster into a distinct phylogenetic arrangement (lineage III) of the UK vaccine strain (lineage IV) characterizing the emergence of a G6 strain phylogenetically distant. In addition, we observed the emergence of G10 and P[11] genotypes in G6P[5] vaccinated dairy cattle herds characterizing failure in heterologous immune protection. These results show the importance of constant monitoring of circulating RVA strains in vaccinated cattle herds for the epidemiological surveillance of the emergence of new viral strains highlighting those with higher virulence and/or zoonotic potential. Finally, the low frequency of diarrhea and the diagnostic of RVA in diarrheic fecal samples were responsible for the exclusion of eight selected dairy herds from the study suggesting that regular vaccination program reduces the frequency and severity of RVA diarrhea in suckling calves.

Keywords: Dairy calf, diarrhea, RVA, genotype, vaccine

Introduction

Rotaviruses (RVs) are considered the widespread cause of diarrhea in humans and in domestic animals, including calves (Barreiros et al., 2004; Alfieri et al., 2006; Papp et al., 2013; Otto et al., 2015). *Rotavirus* genus belongs to *Reoviridae* family with a viral genome composed of 11 double-stranded (ds) RNA segments. The VP6 protein/gene classifies the RVs into nine distinct groups/species (A-I) (Matthijssens et al., 2012; Mihalov-Kovacs et al., 2015), besides a new proposed group/species (J) identified in bats (Banyai et al., 2017). The VP7 and VP4 genes, that codifies the two outer capsid proteins that induce neutralizing antibodies, are used for binary classification of the RVA strains in G and P genotypes, respectively. To date, 51 P and 36 G genotypes are accepted by Rotavirus Classification Working Group (RCWG, 2017). The dsRNA segments reassortment promotes viral evolution, beyond possible adaptation to new hosts, including the humans (Alfieri et al., 2006; Martella et al., 2010).

Neonatal calf diarrhea (NCD) is an important cause of morbidity and mortality in dairy and beef cattle herds worldwide (Snodgrass et al., 1986; Windeyer et al., 2014; Karayel et al., 2017). The NCD is considered a multifactorial syndrome and several enteric pathogens such as virus, bacteria, and protozoa can be involved in this disease (Cho and Yoon, 2014; Coura et al., 2015). Worldwide the rotavirus species A (RVA) is the main viral etiology of NCD, especially in calves up to 30 days old.

The most frequent G and P genotypes in bovine RVA strains are G6, G8 e G10 and P[1], P[5] e P[11]. Nevertheless, at least 11 P (P[1], P[3], P[5-7], P[11], P[14], P[17], P[21], P[29], P[33]), and 12 G (G1-G3, G5, G6, G8, G10, G11, G15, G17, G21, G24) genotypes have been described in bovine RVA field strains (Papp et al., 2013).

Vaccination of cows at the end of gestation is one of the main health management for the control and prophylaxis of bovine RVA. The increase of anti-RVA antibodies titers and the adequate colostrum intake promotes an improvement in passive immunity that protects the calves from RVA infection in the first weeks of age (Cortese, 2009; Bartels et al., 2010; Meganck et al., 2015). In Brazil the commercially available vaccines for bovine RVA control are monovalent, with inactivated RVA G6P[5] (UK strain) or bivalent containing the RVA G6P[1] (NCDV strains) and G10P[11] (B223 strain) genotypes.

Immunity to RVA infection is homotypic, ie, genotype-specific (Van Zaane et al., 1986; Taniguchi et al., 1991; Conner et al., 1993; Karayel et al., 2017). Considering the emergence of different G and P genotypes in a vaccinated herd it is possible to affirm that there is a homologous protection (Adah et al., 2003; Alkan et al., 2010; Malik et al., 2012). However, there is evidence that vaccination can also promote the heterotypic immunity responsible for

protecting against RVA infection by some strains with distinct genotypes (Matsuda et al., 1993; Chang et al., 2000; Durel et al., 2017). Besides that, there is consensus that both in dairy as in beef cattle farms the regular herd vaccination reduces the frequency and intensity of episodes of neonatal diarrhea (Parreno et al., 2004; Gonzalez et al., 2010; Al Mawly et al., 2015).

Studies have reported that the immune pressure promoted by mass vaccination and the viral evolution can drive the occurrence of antigenic variants promoting the emergence of new viral strains with distinct genotypes some of which with higher virulence and / or zoonotic potential (Matthijnsens et al., 2009; Martella et al., 2010; Badaracco et al., 2012; Usonis et al., 2012). Some of these strains may still be responsible for vaccine breakdown. This cross-sectional study monitored the G and P genotypes of RVA field strains identified in dairy cattle herds regularly vaccinated for the bovine RVA infection control.

Materials and Methods

Dairy cattle herd and fecal samples

Fourteen high genetic and milk production dairy cattle herds from Minas Gerais state, southeast region from Brazil were selected for this cross-sectional study. Calf rearing systems were collective and individual pens in 28.6% ($n=4$) and 71.4% ($n=10$) of the herds, respectively.

The farms use a regular vaccination program for neonatal diarrhea control which includes among other microorganisms the bovine RVA UK strain, G6P[5] genotype. The vaccination program is conducted according to the manufacturer's instructions.

To identify the G and P genotypes of RVA field strains circulating in RVA vaccinated dairy cattle herds, each one of the 14 herds were visited only once. On this occasion, 87 diarrheic fecal samples were collected from calves up to 30-day-old.

RVA diagnosis

The nucleic acid of the diarrheic fecal samples was extracted using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate extraction methods (Alfieri et al., 2006). The presence of RVA dsRNA was evaluated by RT-PCR assays for amplification of a product with 1,062 bp (Gouvea et al., 1990) and 876 bp length (Gentsch et al., 1992; Martella et al., 2006) of VP7 and VP4 (VP8*) genes, respectively.

Sequencing

To determine the G and P genotypes in RVA positive fecal samples in RT-PCR, the best G and P RT-PCR amplicon of each RVA positive herd was purified using an Illustra GFX PCR

DNA and Gel Band Purification Kit (GE[®], Buckinghamshire, UK), quantified using Qubit[®] Fluorometer (Invitrogen[®] Life Technologies, Eugene, OR, USA), and sequenced using an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer with a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA) using the same primers from the RT-PCR.

Nucleotide (nt) quality analysis and contig assembly of the RVA gene sequences were performed with Phred and CAP3 software, respectively (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Sequence similarity searches were performed using the basic local alignment search tool (BLAST) software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), to verify the nucleotide similarity with sequences that are deposited in public databases. The program used to obtain a neighbor-joining phylogenetic trees based on the nt were MEGA V7 software using 1,000 replicates to calculate the bootstrapping probabilities (Kumar et al., 2016). The nt sequence identity matrices were constructed using BioEdit software version 7.0.8.0.

The nt sequence data presented in this study have been deposited in GenBank database under accession numbers: Y199 strain - MH016183 and MH016185, Y263 strain - MH026112 and MH026113, and Y375 strain - MH016184 and MH016186.

Results and discussion

Of the 14 dairy cattle herds evaluated in this cross-sectional study in two herds, no 30-day-old calf with diarrhea was found, thus these two herds were excluded from the RVA study. In six other herds, all 20 diarrheic fecal samples collected in order to identify RVA were RT-PCR negative and, therefore, also were excluded from the RVA analysis. In the remaining six herds, it was possible to identify RVA in 25.4% ($n=17$) of the 67 diarrheic fecal evaluated. RVA positive fecal samples were obtained from diarrheic calves aged 4 to 18 days.

The exclusion from the RVA analysis of 8 (57.1%) of the dairy cattle herds initially selected for the study, either because they did not present any calves with diarrhea or because we did not obtain any RVA positive fecal samples indirectly shows that the RVA vaccination to neonatal diarrhea control contributes to reduction in the number of episodes and, mainly, in the severity of neonatal diarrhea. Additionally, the most of the diarrheic fecal samples included in the analysis, from the six RVA positive herds, show soft consistency and none of them was watery (data not shown).

One aspect related to the management that was observed is that in all eight dairy herds excluded from the study due to the absence of neonatal diarrhea or absence of RVA infection, the calf rearing system used was in individual pens. In contrast, in four of the six herds maintained in the study, the calves were raised in collective pens. This observation shows that

the calf rearing system where calves of different ages are kept in the same environment may constitute a risk factor for neonatal diarrhea and also for RVA infection in dairy cattle herds.

Diarrhea due to RVA infection has been reported in animals and children regularly vaccinated worldwide (Barreiros et al., 2004; Parreno et al., 2004; Gurgel et al., 2007; Lorenzetti et al., 2011; Rocha et al., 2017). Studies conducted to monitor the genotypes of RVA field strains in vaccinated hosts present a great epidemiological and molecular importance.

The G and P genotypes of RVA field strains identified in five of the six the vaccinated dairy cattle herds presented genotype G6P[11] and one herd G10P[11]. The G6 genotype present in all RVA field strains clustered together with G6-lineage III strains, frequently described in RVA strains identified in dairy cattle herds (Badaracco et al., 2013; Rocha et al., 2017), distant from the RVA UK vaccine strain (lineage IV) characterizing the emergence of a G6 strain phylogenetically distant (Figure 1). Two Brazilian RVA strains identified in this study, named Y199 and Y263 strains, showed 94 to 98.7% and 92.8 to 96.6% of nt identity, respectively with other G6 strains that belong to lineage III. In addition, we observed the emergence of G10 and P[11] genotypes in G6P[5] vaccinated dairy cattle herds characterizing failure in heterologous immune protection.

In Brazil, Barreiros et al. (2004) described in G6P[1] (NCDV strain) vaccinated cattle herds different G and P genotypes in RVA field strains being the genotype G6P[11] the combination more frequent. In another study, the genotype G6P[5] was the unique genotype combination described in RVA field strains in a neonatal diarrhea outbreak in beef cattle herd vaccinated with the commercial vaccine containing G6P[1] and G10P[11] genotypes (Medeiros et al., 2015). More recently, also in Brazil, genotype G6P[11] was identified in six dairy herds regularly vaccinated with RVA NCDV (G6P[1]) and B223 strains (G10P[11]) (Rocha et al., 2017).

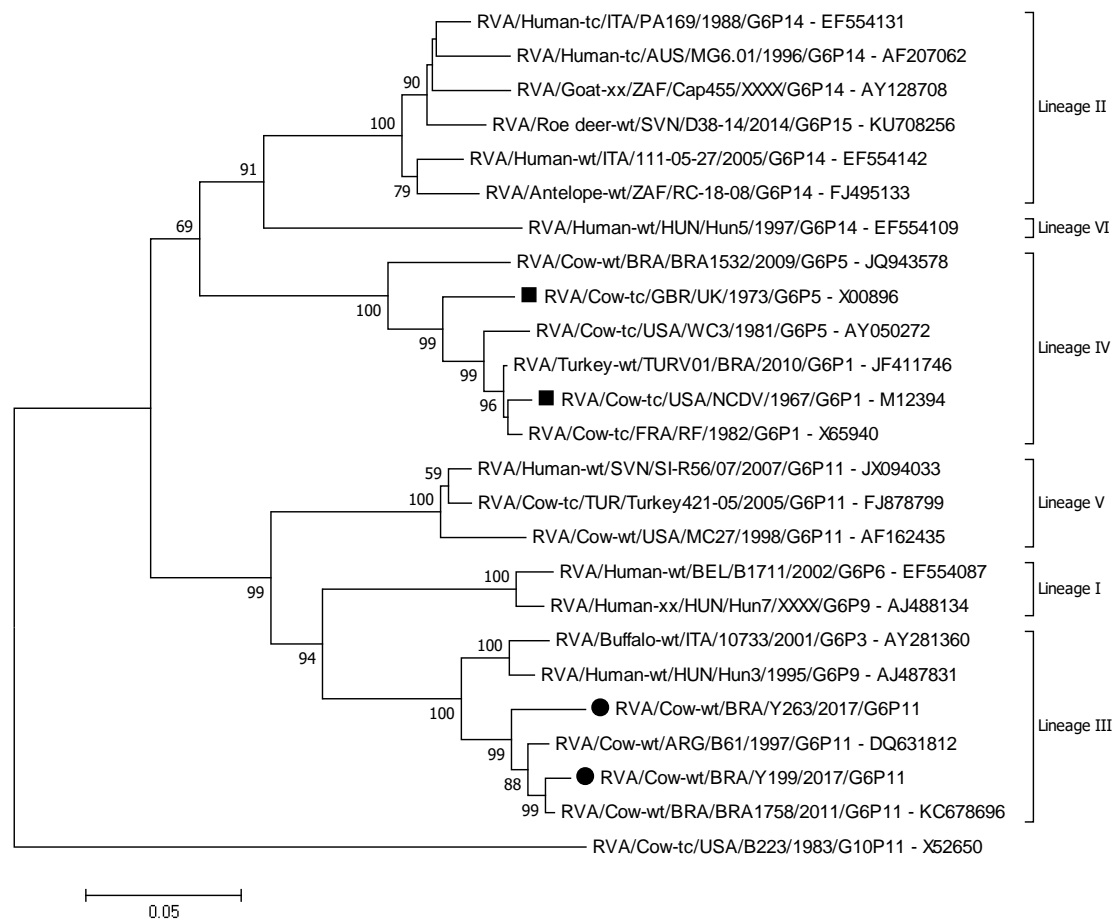


Figure 1. Phylogenetic tree of the VP7 gene of RVA, reconstructed using 830bp of genotype G6 of the Y199 and Y263 strains, represented by a black circle, and reference strains available in GenBank. The prototypes of Brazilian vaccines are indicated by a black square. The numbers adjacent to the nodes represent the percentage of bootstrap support (1,000 replicates) for the clusters. Bootstrap values less than 50% are not shown. The strain used as outgroup was the prototype strain B223 (G10P[11]). The GenBank accession number were subsequent to the name of the sequences.

Worldwide G6P[5], G6P[11], and G10P[11] are the most common G and P genotypes identified in RVA strains causing neonatal diarrhea outbreaks in both beef and dairy calves (Papp et al., 2013). In Brazil, epidemiological studies with both longitudinal or cross-sectional design have shown that the G6P[5] genotype is the most common in RVA vaccinated and unvaccinated dairy and beef cattle herds (Alfieri et al., 2004; Barreiros et al., 2004; Buzinaro et al., 2009; Medeiros et al., 2015). However, this RVA genotype was not identified in any of the six dairy cattle herds evaluated in this study.

In RVA vaccinated herds the immune pressure developed by mass vaccination can be responsible for the occurrence of RVA field strains with different genotypes from the vaccine strain (Matthijnsens et al., 2009; Cashman et al., 2010). Another reason for the occurrence of vaccine failures in RVA vaccination programs is the great diversity and variability G and P genotypes in the RVA strains. Thus, vaccines may fail to provide good protection against heterologous RVA strains ie strains with different genotypes of those found in vaccine strains (Kaplon et al., 2013; Karayel et al., 2017).

This study described the occurrence of two (G6P[11] and G10P[11]) RVA genotypes in six G6P[5] vaccinated dairy cattle herds. This result showed an excellent passive immunity against the homologous RVA strain present in the vaccine but also characterized the occurrence of heterologous infections. However, as reported in other studies, despite the possibility of the occurrence of heterologous infections in the dairy cattle herds included in the study were observed considerable reductions in the frequency and intensity of neonatal diarrhea in calves of all herds.

The results of this study show the importance of constant monitoring of circulating RVA strains in neonatal diarrhea outbreaks in dairy cattle herds, in a geographical region, or even in a country. Only with this approach we can evaluate the effectiveness of NCD control and prevention programs, as well as determine the cost-effectiveness of RVA vaccination. In addition, epidemiological surveillance may identify the emergence of new RVA strains highlighting of those with higher virulence and/or zoonotic potential.

References

- Adah, M. I., S. Nagashima, M. Wakuda, and K. Taniguchi. 2003. Close relationship between G8-serotype bovine and human rotaviruses isolated in Nigeria. *J Clin Microbiol* 41(8):3945-3950.
- Al Mawly, J., A. Grinberg, D. Prattley, J. Moffat, J. Marshall, and N. French. 2015. Risk factors for neonatal calf diarrhoea and enteropathogen shedding in New Zealand dairy farms. *Vet J* 203(2):155-160.
- Alfieri, A. A., M. E. Parazzi, E. Takiuchi, K. C. Medici, and A. F. Alfieri. 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop Anim Health Prod* 38(7-8):521-526.

- Alfieri, A. F., A. A. Alfieri, M. A. Barreiros, J. P. Leite, and L. J. Richtzenhain. 2004. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Vet Microbiol* 99(3-4):167-173.
- Alkan, F., A. Ozkul, T. C. Oguzoglu, M. O. Timurkan, E. Caliskan, V. Martella, and I. Burgu. 2010. Distribution of G (VP7) and P (VP4) genotypes of group A bovine rotaviruses from Turkish calves with diarrhea, 1997-2008. *Vet Microbiol* 141(3-4):231-237.
- Badaracco, A., L. Garaicoechea, D. Rodriguez, E. L. Uriarte, A. Odeon, G. Bilbao, R. Galarza, A. Abdala, F. Fernandez, and V. Parreno. 2012. Bovine rotavirus strains circulating in beef and dairy herds in Argentina from 2004 to 2010. *Vet Microbiol* 158(3-4):394-399.
- Badaracco, A., J. Matthijnsens, S. Romero, E. Heylen, M. Zeller, L. Garaicoechea, M. Van Ranst, and V. Parreno. 2013. Discovery and molecular characterization of a group A rotavirus strain detected in an Argentinean vicuna (*Vicugna vicugna*). *Vet Microbiol* 161(3-4):247-254.
- Banyai, K., G. Kemenesi, I. Budinski, F. Foldes, B. Zana, S. Marton, R. Varga-Kugler, M. Oldal, K. Kurucz, and F. Jakab. 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect Genet Evol* 48:19-26.
- Barreiros, M. A., A. F. Alfieri, K. C. Medici, J. P. Leite, and A. A. Alfieri. 2004. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1],G6) rotavirus strain. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 51(3):104-109.
- Bartels, C. J., M. Holzhauser, R. Jorritsma, W. A. Swart, and T. J. Lam. 2010. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev Vet Med* 93(2-3):162-169.
- Buzinaro, M. G., S. I. Samara, E. A. S. Pereira, D. B. Fuentes, and M. C. S. Oliveira. 2009. Ocorrência dos Genótipos G e P de Rotavirus do grupo A em Bezerros de Rebanhos de Corte no Estado de São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol* 76(1):99-105.
- Cashman, O., G. Lennon, R. D. Sleator, E. Power, S. Fanning, and H. O'Shea. 2010. Changing profile of the bovine rotavirus G6 population in the south of Ireland from 2002 to 2009. *Vet Microbiol* 146(3-4):238-244.
- Chang, K. O., A. V. Parwani, and L. J. Saif. 2000. Comparative sequence analysis of the VP7 genes of G6, G8 and G10 bovine group A rotaviruses and further characterization of G6 subtypes. *Arch Virol* 145(4):725-737.
- Cho, Y. I. and K. J. Yoon. 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J Vet Sci* 15(1):1-17.
- Conner, M. E., S. E. Crawford, C. Barone, and M. K. Estes. 1993. Rotavirus vaccine administered parenterally induces protective immunity. *J Virol* 67(11):6633-6641.

- Cortese, V. S. 2009. Neonatal immunology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 25(1):221-227.
- Coura, F. M., M. D. Freitas, J. Ribeiro, R. A. de Leme, C. de Souza, A. A. Alfieri, E. J. Facury Filho, A. U. de Carvalho, M. X. Silva, A. P. Lage, and M. B. Heinemann. 2015. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Trop Anim Health Prod* 47(1):3-11.
- Durel, L., C. Rose, T. Bainbridge, J. Roubert, K.-U. Dressel, J. Bennemann, A. Rückner, T. Vahlenkamp, and R. Maillard. 2017. Immune response of mature cows subjected to annual booster vaccination against neonatal calf diarrhoea with two different commercial vaccines: A non-inferiority study. *Livest Sci* 204:52-58.
- Gentsch, J. R., R. I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B. K. Das, and M. K. Bhan. 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30(6):1365-1373.
- Gonzalez, D. D., M. V. Mozgovej, D. Bellido, D. V. Rodriguez, F. M. Fernandez, A. Wigdorovitz, V. G. Parreno, and M. J. Dus Santos. 2010. Evaluation of a bovine rotavirus VP6 vaccine efficacy in the calf model of infection and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 137(1-2):155-160.
- Gouvea, V., R. I. Glass, P. Woods, K. Taniguchi, H. F. Clark, B. Forrester, and Z. Y. Fang. 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28(2):276-282.
- Gurgel, R. Q., L. E. Cuevas, S. C. Vieira, V. C. Barros, P. B. Fontes, E. F. Salustino, O. Nakagomi, T. Nakagomi, W. Dove, N. Cunliffe, and C. A. Hart. 2007. Predominance of rotavirus P[4]G2 in a vaccinated population, Brazil. *Emerg Infect Dis* 13(10):1571-1573.
- Kaplon, J., C. Fremy, S. Bernard, L. Rehby, S. Aho, P. Pothier, and K. Ambert-Balay. 2013. Impact of rotavirus vaccine on rotavirus genotypes and caliciviruses circulating in French cattle. *Vaccine* 31(20):2433-2440.
- Karayel, I., E. Feher, S. Marton, N. Coskun, K. Banyai, and F. Alkan. 2017. Putative vaccine breakthrough event associated with heterotypic rotavirus infection in newborn calves, Turkey, 2015. *Vet Microbiol* 201:7-13.
- Kumar, S., G. Stecher, and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870-1874.
- Lorenzetti, E., T. N. da Silva Medeiros, A. F. Alfieri, and A. A. Alfieri. 2011. Genetic heterogeneity of wild-type G4P[6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. *Vet Microbiol* 154(1-2):191-196.

- Malik, Y. S., K. Sharma, N. Vaid, S. Chakravarti, K. M. Chandrashekar, S. S. Basera, R. Singh, Minakshi, G. Prasad, B. R. Gulati, K. N. Bhilegaonkar, and A. B. Pandey. 2012. Frequency of group A rotavirus with mixed G and P genotypes in bovines: predominance of G3 genotype and its emergence in combination with G8/G10 types. *J Vet Sci* 13(3):271-278.
- Martella, V., K. Banyai, J. Matthijssens, C. Buonavoglia, and M. Ciarlet. 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol* 140(3-4):246-255.
- Martella, V., M. Ciarlet, K. Banyai, E. Lorusso, A. Cavalli, M. Corrente, G. Elia, S. Arista, M. Camero, C. Desario, N. Decaro, A. Lavazza, and C. Buonavoglia. 2006. Identification of a novel VP4 genotype carried by a serotype G5 porcine rotavirus strain. *Virology* 346(2):301-311.
- Matsuda, Y., Y. Isegawa, G. N. Woode, S. Zheng, E. Kaga, T. Nakagomi, S. Ueda, and O. Nakagomi. 1993. Two-way cross-neutralization mediated by a shared P (VP4) serotype between bovine rotavirus strains with distinct G (VP7) serotypes. *J Clin Microbiol* 31(2):354-358.
- Matthijssens, J., J. Bilcke, M. Ciarlet, V. Martella, K. Banyai, M. Rahman, M. Zeller, P. Beutels, P. Van Damme, and M. Van Ranst. 2009. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol* 4(10):1303-1316.
- Matthijssens, J., P. H. Otto, M. Ciarlet, U. Desselberger, M. Van Ranst, and R. Johne. 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch Virol* 157(6):1177-1182.
- Medeiros, T. N. S., E. Lorenzetti, A. F. Alfieri, and A. A. Alfieri. 2015. Phylogenetic analysis of a G6P[5] bovine rotavirus strain isolated in a neonatal diarrhea outbreak in a beef cattle herd vaccinated with G6P[1] and G10P[11] genotypes. *Arch Virol* 160(2):447-451.
- Meganck, V., G. Hoflack, S. Piepers, and G. Opsomer. 2015. Evaluation of a protocol to reduce the incidence of neonatal calf diarrhoea on dairy herds. *Prev Vet Med* 118(1):64-70.
- Mihalov-Kovacs, E., A. Gellert, S. Marton, S. L. Farkas, E. Feher, M. Oldal, F. Jakab, V. Martella, and K. Banyai. 2015. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg Infect Dis* 21(4):660-663.
- Otto, P. H., S. Rosenhain, M. C. Elschner, H. Hotzel, P. Machnowska, E. Trojnar, K. Hoffmann, and R. Johne. 2015. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet Microbiol* 179(3-4):168-176.

- Papp, H., B. Laszlo, F. Jakab, B. Ganesh, S. De Grazia, J. Matthijnsens, M. Ciarlet, V. Martella, and K. Banyai. 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol* 165(3-4):190-199.
- Parreno, V., C. Bejar, A. Vagnozzi, M. Barrandeguy, V. Costantini, M. I. Craig, L. Yuan, D. Hodgins, L. Saif, and F. Fernandez. 2004. Modulation by colostrum-acquired maternal antibodies of systemic and mucosal antibody responses to rotavirus in calves experimentally challenged with bovine rotavirus. *Vet Immunol Immunopathol* 100(1-2):7-24.
- RCWG. 2017. Rotavirus Classification Working Group. Newly assigned genotypes - June 30th 2017. February 10th 2018. <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
- Rocha, T. G., F. D. Silva, F. Gregori, A. A. Alfieri, M. D. Buzinaro, and J. J. Fagliari. 2017. Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. *Trop Anim Health Prod* 49(4):783-790.
- Snodgrass, D. R., H. R. Terzolo, D. Sherwood, I. Campbell, J. D. Menzies, and B. A. Syngé. 1986. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet Rec* 119(2):31-34.
- Taniguchi, K., T. Urasawa, N. Kobayashi, M. U. Ahmed, N. Adachi, S. Chiba, and S. Urasawa. 1991. Antibody response to serotype-specific and cross-reactive neutralization epitopes on VP4 and VP7 after rotavirus infection or vaccination. *J Clin Microbiol* 29(3):483-487.
- Usonis, V., I. Ivaskėviciene, U. Desselberger, C. Rodrigo, and R. E. C. Pediatric. 2012. The unpredictable diversity of co-circulating rotavirus types in Europe and the possible impact of universal mass vaccination programmes on rotavirus genotype incidence. *Vaccine* 30(31):4596-4605.
- Van Zaane, D., J. Ijzerman, and P. W. De Leeuw. 1986. Intestinal antibody response after vaccination and infection with rotavirus of calves fed colostrum with or without rotavirus antibody. *Vet Immunol Immunopathol* 11(1):45-63.
- Windeyer, M. C., K. E. Leslie, S. M. Godden, D. C. Hodgins, K. D. Lissemore, and S. J. LeBlanc. 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Prev Vet Med* 113(2):231-240.

4 CONCLUSÕES

4.CONCLUSÕES

- No estudo longitudinal, realizado em bezerras nascidas de vacas vacinadas com RVA genótipos G6P[5], houve redução na intensidade de diarreia neonatal, sendo possível identificar que os genótipos G e P identificados nas cepas de campo (G10P[11]) foram diferentes dos genótipos presentes na cepa vacinal.
- No estudo transversal, também foi possível observar reduções nos episódios de diarreia e no diagnóstico de RVA em fezes diarreicas. Adicionalmente, em cinco rebanhos bovinos leiteiros regularmente vacinados contra rotavirose foram identificadas bezerras infectadas com RVA genótipo G6, também presente na vacina. Entretanto, as análises filogenéticas demonstraram que o genótipo G6 das cepas de campo pertenciam a linhagem III que é distinta da linhagem da cepa G6 vacinal que é classificada na linhagem IV.
- No estudo transversal também foi identificada a emergência de RVA genótipos G10 e P[11], não presentes na cepa vacinal, caracterizando falha na proteção imune heteróloga e que a pressão imune promovida pela vacina pode ter sido responsável pela emergência de cepas de campo de RVA portadoras de genótipos distintos da cepa vacinal.

5.1. Lista de Reagentes

1. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
2. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
3. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab[®])
4. Ácido cítrico P.A. – Anidro (Reagen[®])
5. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
6. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
7. Agarose (Invitrogen[™] Life Technologies)
8. Água DEPC (Dietyl pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies[®])
9. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
10. Álcool isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) P.M. 88,15 (Synth[®])
11. Bicarbonato de sódio, P.A. (NaHCO_3) P.M. 84,01 (Biotec[®])
12. *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit* (Applied Biosystems[®])
13. Brometo de etídeo ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
14. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (Invitrogen[™] Life Technologies)
15. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies[®])
16. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
17. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
18. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
19. Dimetil sulfóxido (DMSO) $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ (Sigma[®])
20. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
21. Dithiothreitol (DTT-10 mM) (Invitrogen Life Technologies[™])
22. DNA Ladder (100 pb) (Invitrogen Life Technologies[™])
23. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μL ; 25 μmol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[™])
24. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (Invitrogen Life Technologies[™])
25. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies[™])
26. Formaldeído P.A. (Vetec[®])
27. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
28. Fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 177,99 (Merck[®])

29. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
30. Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) P.M. 180,16 (Reagen[®])
31. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
32. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
33. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
34. Metanol P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) - *forward* Beg9 (VP7) - (forward; 5'-GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG -3'; nucleotídeo 1-28) Gouvea et al. (1990) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
36. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) - *reverse* End9 (VP7) - (reverse; 5'-GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG -3'; nucleotídeo 1062-1036) Gouvea et al. (1990) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
37. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) - *forward* Con3M (VP4) - (forward; 5'-GGCTATAAAATGGCTTCGCTCATTATAGACA -3'; nucleotídeo 11-32) Martella et al. (2006) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
38. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) - *reverse* Con 2 (VP4) - (reverse; 5'-ATTTCCGACCATTATAACC -3'; nucleotídeo 868-887) Gentsch et al.(1992) - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies[®])
39. PCR-*buffer* (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
40. *Platinum* Taq DNA *Polymerase recombinant* 500 units (Invitrogen Life Technologies[™])
41. Proteinase K (10mM Tris; 1mM *ethylenediamine tetra-acetic acid* [EDTA]; 0.5% Nonidet P40; 1% *sodium dodecyl sulfate* [SDS]; 0.2mg/mL proteinase K) (Invitrogen Life Technologies[™])
42. PureLink[™] *Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Invitrogen Life Technologies[™])
43. RT-*buffer* (5x) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
44. *QuantIT*[™] *dsDNA BR assay kit* (Invitrogen Life Technologies[™])
45. Sacarose, P.A. – sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$) P.M. 342,31 (Reagen[®])
46. Tris (Nuclear[®])
47. Triton x-100 (Synth[®])

5.2 Soluções e Tampões

- **Fenol/clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
 - 25 mL de fenol saturado em água
 - 24 mL de clorofórmio
 - 1 mL de álcool isoamílico

- **SDS 10%**
 - 5 g de dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
 - Água bidestilada q.s.p. 50 mL

- **Hidratação da sílica**
 - 6 g de sílica (SIGMA[®])
 - Adicionar 500 mL de água ultrapura autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Ajustar o pH (pH 2,0)
 - Aliquotar

- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 g de Triton 100x

- **Solução L2**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Gel de agarose 1%**
 - 0,5 g de agarose
 - 50 mL de tampão TBE 1x
 - 20 μ L de brometo de etídio

- **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 Fosfato Salina – PBS**
 - 137 mM Cloreto de sódio (NaCl)
 - 3 mM Cloreto de potássio (KCl)
 - 8 mM Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4)
 - 15 mM Potássio fosfato monobásico (KH_2PO_4)
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 500 mL

- **Diluição de primers**
 - RT-PCR P (VP4) consensual
 - *Primer Con 3M forward*
 - Concentração: 46,2 nmol
 - Data de fabricação: Maio 2014
 - $46,2 \times 1000 = 46200 \text{ pmol}$
 - $46200 / 200 = 231 \text{ } \mu\text{L}$ água ultra-pura

- *Primer Con 2 reverse*

Concentração: 98,9 nmol

Data de fabricação: Maio 2014

$98,9 \times 1000 = 98900 \text{ pmol}$

$98800 / 200 = 494 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

RT-PCR G (VP7) consensual

- *Primer Beg9 forward*

Concentração: 40,3 nmol

Data de fabricação: Agosto 2017

$40,3 \times 100 = 40300 \text{ pmol}$

$40300 / 200 = 201,5 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

- *Primer End 9 reverse*

Concentração: 113 nmol

Data de fabricação: Maio 2014

$113 \times 1000 = 113000 \text{ pmol}$

$113000 / 200 = 565 \text{ } \mu\text{L}$ de água ultrapura

Solução estoque: ressuspender em água ultrapura para obtenção de solução 10x []

Solução de uso de todos os primers: diluir 1:10 a solução estoque em água ultrapura.

Concentração final: 20 pmol / μL

- **Diluição de dNTP**

- solução estoque (100 mM) – 100 μL de cada dNTP

- solução uso (10 mM) – 10 μL da solução estoque + 90 μL de água ultrapura autoclavada

5.3 Protocolo de Técnicas

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

1. *Suspensão fecal – extração bruta*

- 100 µL ou 100 mg de fezes
- 500 µL de PBS
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 5000 x g/3 min
- Utilizar 500 µL do sobrenadante para extração

3. *Extração do ácido nucleico*

Fase I – Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico

- 500 µL da suspensão fecal
- Adicionar 500 µL de SDS 10% ou 20 µL de SDS 10 %
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/20 min
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Adicionar 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em vórtex
- 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 µL da solução L6
- Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar em temperatura ambiente /30 min
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M

- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 μ L de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1 mL de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar sobrenadante
- Secar o pellet em termo bloco a 60 °C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria a 56 °C (15 min)
- Adicionar 50 μ L de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x g/4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μ L
- Estocar à -20 °C até a utilização

- **Transcrição reversa (RT)**

- **Mix desnaturação**

Mix Desnaturação P (VP4) e G (VP7)
<i>Primer forward</i> (20 pmol) - 1 μ L <i>Primer reverse</i> (20 pmol) - 1 μ L Água ultrapura - 3 μ L
Volume final - 5 μ L

- **Mix transcrição reversa (RT-MIX)**

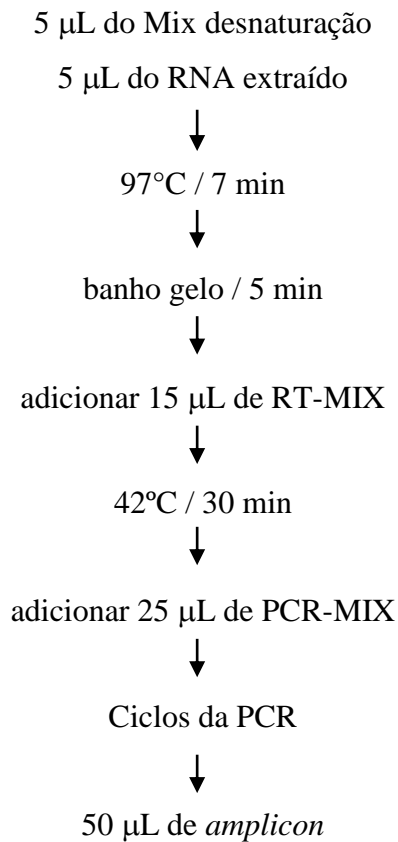
Mix RT-PCR
Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 μ L MgCl ₂ 50 mM - 2,5 μ L dNTP 2,5 mM - 4 μ L <i>SuperScript II</i> ® 200 U / μ L - 0,15 μ L Água ultrapura - 5,85 μ L
Volume final - 15 μ L

- **Reação em cadeia da polimerase (PCR)**

- **Mix da reação em cadeia da polimerase (PCR-MIX)**

Mix PCR G (VP7) e P (VP4)
Tampão 10 x pH 8,4 - 2,5 μ L dNTP 2,5 mM - 4 μ L <i>Platinum</i> ® <i>Taq DNA Polymerase</i> 5 U / μ L - 0,25 μ L <i>Primer forward</i> (20 pmol) - 1 μ L <i>Primer reverse</i> (20 pmol) - 1 μ L Água ultrapura - 16,25 μ L
Volume final - 25 μ L

Esquema da RT-PCR



Etapas da PCR	
Ciclos	VP4 e VP7
Desnaturação inicial	94°C / 3 min
Desnaturação	94°C / 30 s
Anelamento	42°C / 30 s
Extensão	72°C / 45 s
Nº de ciclos térmicos	40
Extensão final	72°C / 7 min

- **Eletroforese em gel de agarose a 2%**

- 1,0 g de agarose

- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) pH 8,4

- 20 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

São utilizados 5 µL do *amplicon* e 1 µL do tampão de amostra. Corrida eletroforética sob voltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes por aproximadamente 50 min.

- **Purificação de produto de PCR excisado do gel**

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.

2. Adicionar 3 volumes do tampão de solubilização em gel (L3) para cada 1 volume de gel.

3. Incubar o tubo a 50 °C/15 min, homogeneizando a cada 3 min.

4. Transferir o gel dissolvido com o amplificado de interesse para um tubo coletor com coluna.

5. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.

6. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.

7. Adicionar 500 µL do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.

8. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.

9. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.

10. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.

11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.

12. Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.

13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.

14. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.

15. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C.

- **Quantificação de produto de PCR**

(Certificar-se de que todos os reagentes estão em temperatura ambiente)

1. Preparar a solução Quant-iT™ *Working Solution* diluindo o reagente Quant-iT™ em *Buffer* Quant-iT™ 1:200. São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.

2. Homogeneizar em vórtex.

3. No microtubo das amostras adicionar 198 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 2 µL do fragmento de DNA purificado.

4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 10 μL do padrão 0.
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 10 μL do padrão 100.
6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s.
7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min.
8. Realizar a leitura usando *Qubit™ fluorometer* (Invitrogen™ Life Technologies, EUA).
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.

- **Sequenciamento pelo método Sanger**

Preparo de amostras para o sequenciamento

As amostras e os *primers* devem estar na concentração demonstrada na tabela abaixo:

Tamanho do fragmento (pares de base)	Concentração da amostra (ng/ μL ou $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Concentração do <i>primer</i> (pmol/ μL ou μM)
< 300	2	5
300 – 700	4	5
>700	10	10

Mix do sequenciamento

Reagente*	Volume
<i>BigDye Terminator v3.1</i>	2,0 μL
Tampão 5x	1,5 μL
Água ultrapura autoclavada	0,5 μL
Volume final	4,0 μL

**BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

O volume final de mix do sequenciamento é adicionado a 5 μL de amostra purificada + 1 μL de *primer*.

Ciclos de tempo e temperatura da reação de sequenciamento*

Reação	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	15 seg	35
Anelamento	50	15 seg	35
Extensão	60	4 min	35

*Programa recomendado pela *Applied Biosystems*.

Precipitação com EDTA e etanol

- Adicionar 10 µL da reação de sequenciamento em uma cavidade da placa *MicroAmp® Optical 96-Well Reaction* (0,2 mL) (*Applied Biosystems*).
- Adicionar 2,5 µL de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM pH 8,0.
- Adicionar 30 µL de etanol 100%.
- Homogeneizar lentamente a placa.
- Incubar a placa por 10 min em temperatura ambiente.
- Centrifugar a 3000 x g durante 30 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 3000 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Adicionar 100 µL de etanol 70%.
- Centrifugar a 3000 x g durante 1 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 3000 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Cobrir a placa com papel e deixar em temperatura ambiente por 10 min.
- Adicionar 10 µL de formamida (HIDI).
- Adicionar a septa.
- Homogeneizar a placa em vórtex.
- Submeter à placa a um *spin* no *miniplate spinner*.
- Colocar a placa em termociclador (tampa aberta) por 95 °C por 5 min.
- Colocar a placa em *cooler* ou banho de gelo por 1 min.
- Após a precipitação com EDTA e etanol, a placa é inserida no sequenciador (*ABI 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) para realizar a eletroforese capilar.

5.4 Lista de Softwares

- *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- *BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool*
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)