

Adriele Rodrigues Moreira Miranda

Detecção de Rotavírus das espécies *A*, *B* e *C* em bovinos no
Rio de Janeiro



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, como
pré-requisito para a obtenção do grau de
Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro

Outubro/2021

Trabalho realizado no Departamento de virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Dr. Gabriella Mendes e Coorientação da Prof. Norma Santos

Ficha Catalográfica

CIP - Catalogação na Publicação

M671d Miranda, Adriele Rodrigues Moreira
 Detecção de Rotavírus das espécies A, B e C em
 bovinos no Rio de Janeiro / Adriele Rodrigues
 Moreira Miranda. -- Rio de Janeiro, 2021.
 46 f.

 Orientadora: Gabriella Mendes.
 Coorientadora: Norma Santos.
 Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
 de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
 Microbiologia e Imunologia, 2021.

 1. Rotavírus. 2. Bovinos. 3. Diarreia viral. 4.
 Epidemiologia. I. Mendes, Gabriella, orient. II.
 Santos, Norma, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: Adriele Rodrigues Moreira Miranda

DRE: 116012781

BANCA EXAMINADORA: Prof. Dr. José Nelson Couceiro (Presidente)
Profa. Dra. Maria Teresa Villela Romanos
Dr. Fábio Burack da Costa
Profa. Dra. Ana Maria Mazotto (Suplente)

Título da Monografia: “Detecção de Rotavírus das espécies A, B e C em bovinos no Rio de Janeiro”


Local: Sala virtual <https://meet.google.com/imd-dyzj-yrb>

Data e hora de início: **15 de outubro de 2021 às 09:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **10,0** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.


Rio de Janeiro, 15 de outubro de 2021.

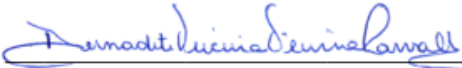
NOTA	Banca Examinadora:
10,0	Prof. Dr. José Nelson Couceiro
10,0	Profa. Dra. Maria Teresa Villela Romanos
10,0	Dr. Fábio Burack da Costa

Presidente da banca:  _____
Prof. Dr. José Nelson Couceiro

Aluno: _____

Adriele Rodrigues Moreira Miranda

Orientador: 
Prof. Dra. Gabriella Mendes / Coorientador: Profa. Dra. Norma Suely de Oliveira Santos

Coordenador de TCC: _____

Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Agradecimentos

As Profas. Norma e Gabriella sou imensamente grata por terem me aceitado no laboratório me dando a oportunidade de aprendizado, pela orientação, dedicação, incentivo e confiança, além da compreensão e da oportunidade de uma nova chance, eu não chegaria aqui sem essa oportunidade.

A equipe do laboratório, Ariane, Beatriz Rolim, Beatriz Cruz, Fábio, Juliana, Lucas, Mariana, Patrícia e Soluza, por terem sido incríveis companhias de laboratório, pelas conversas, pelos ensinamentos, pelas idas ao bandejão, pelos lanches e por terem dividido vários momentos juntos.

A Profa. Bernadete que me escutou e me incentivou e não desistiu de mim, sem a sua força e sua ajuda eu não teria perseverado.

A minha querida família que me apoiou e me incentivou a fazer esse curso, que mesmo longe fisicamente sempre estiveram perto de mim, fazendo de tudo para me manter aqui, sem eles não conseguiria sobreviver um dia na universidade.

As pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer no Instituto e ser amiga, Carol que me ofereceu um lar e vários *roles*, Isis que sempre me dava juízo, Alex que foi um incrível companheiro de casa que sempre me ajudou e era responsável, que sempre cuidou de mim e não deixava eu fazer loucuras, que me fez conhecer e amar a Nina, Michel que dividia os melhores momentos de cozinhar e comer, que me faz rir como ninguém, que era tia comigo, Úrsula que é minha *best*, uma grande companheira, que sempre estava lá para me consolar, que sempre tinha uma notícia quente para contar, que sempre me deu vários conselhos e me fazia ver a razão, ao cafezinho que me deu amigos para uma vida, companheiros de fofocas, de fila bandejão, de bebidas, *roles* e viagens, a todos obrigada pela amizade e por estarem sempre comigo.

Aos meus amigos da vida, Ana, Jessica, Julia, Rodrigo, Ruan e Thifani, obrigada pelas festas, as longas viagens de ônibus, as idas à praia, aos dias de karaokê, aos rodízios de pote, aos *roles* loucos que sempre davam errado, mas davam certo no final, obrigada pela amizade, por cuidarem de mim quando eu precisei e pelos momentos de lazer que mantinham minha sanidade.

A UFRJ e ao Instituto de Microbiologia por terem sido uma segunda casa para mim, me acolhendo e oferecendo novas experiências e oportunidades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro.

Resumo

Adrielle Rodrigues Moreira Miranda

Deteccção de rotavírus da espécies *A*, *B* e *C* em bovinos no Rio de Janeiro

Orientador: Gabriella Mendes

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os rotavírus (RV) são agentes de doenças diarreicas em bezerros em todo o mundo, resultando em perda de produtividade e economia dos produtores. No entanto, várias facetas das doenças diarreicas causadas por RV de bovinos (BoRV) não são adequadamente compreendidas. A pecuária, tem grande relevância no cenário produtivo brasileiro, que possui o segundo maior rebanho mundial de bovinos, sendo o maior exportador e o segundo maior produtor de carne bovina. Portanto, o monitoramento desses animais para a detecção de agentes patogênicos é crucial, para garantir a sanidade animal e a produtividade do rebanho. Os BoRV são classificados no gênero *Rotavirus* da família *Reoviridae* divididos em 3 espécies (*A*, *B* e *C*). Os BoRVA são detectados com maior frequência em animais doentes. O objetivo deste estudo é contribuir para o monitoramento da circulação de BoRV em rebanhos bovinos no estado do Rio de Janeiro. Foram coletadas amostras fecais de 94 bovinos leiteiros, em 9 propriedades rurais de base familiar, nas cidades de Aperibé, Campos dos Goytacazes, Itaboraí, Itaocara e Sampaio Correia, localizadas em diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro, no período de setembro de 2013 a agosto de 2014. As amostras foram obtidas de animais com idade variada (entre 3 dias e 10 meses) e classificadas como diarreicas ou não diarreicas de acordo com a consistência e aspecto das fezes. A detecção viral foi realizada por RT-PCR utilizando iniciadores específicos que amplificam uma porção do gene que codifica a proteína VP6 de cada uma das espécies pesquisadas. Vinte e seis (27,7 %) foram positivas para pelo menos uma das espécies pesquisadas: 22 (23,4%) amostras foram positivas somente para BoRVA; 3 (3,2%) positivas para BoRVC e uma amostra (1,1%) apresentou coinfeccção de BoRVA e BoRVC. Não foi detectada a presença de RVB. Sete (21,9%; n = 32) animais com quadros de diarreia e 19 (30,1% n = 62) dos animais assintomáticos foram positivos, não sendo observada diferença significativa na positividade ($p = 0,3677$) (Tabela 2). O BoRV foi detectado em todas as propriedades estudadas, em uma frequência entre 14,3% e 80%, demonstrando a ampla circulação do vírus em quatro das sete regiões do estado do Rio de Janeiro. A infecção foi mais frequente entre animais ≤ 6 meses de idade. A análise das sequências de uma porção da VP6 identificou o genótipo I2. Os resultados obtidos neste

estudo, demonstraram a circulação de BoRV em todos os municípios pesquisados, abrangendo 4 das 7 regiões do estado fluminense. Considerando a elevada frequência da infecção por BoRV encontrada, é possível especular que este patógeno possa estar amplamente disseminado no rebanho bovino do estado. Foi ainda demonstrada a presença de BoRVC no rebanho bovino do estado, sendo esta a primeira descrição desse agente em bovinos no país. Desta forma, os dados aqui apresentados são relevantes e devem contribuir para aprimorar o conhecimento sobre a importância e disseminação do BoRV no território nacional e auxiliar no planejamento e implantação de medidas de controle e prevenção da rotavirose bovina no Brasil.

Palavras-chave: Rotavírus; Bovinos; Diarreia viral; Epidemiologia

Abstract

Adrielle Rodrigues Moreira Miranda

Detecção de rotavírus da espécies *A*, *B* e *C* em bovinos no Rio de Janeiro

Orientador: Gabriella Mendes

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Rotaviruses (RV) are agents of diarrheal diseases in calves worldwide, resulting in loss of productivity and economy for producers. However, several facets of diarrheal diseases caused by bovine RV (BoRV) are not adequately understood. Livestock has great relevance in the Brazilian productive scenario, which has the second largest cattle herd in the world, being the largest exporter and second largest producer of beef. Therefore, monitoring these animals to detect pathogens is crucial to ensure animal health and herd productivity. BoRVs are classified in the genus *Rotavirus* of the *Reoviridae* family, divided into 3 species (*A*, *B* and *C*). BoRVAs are most frequently detected in sick animals. The aim of this study is to contribute to the monitoring of BoRV circulation in cattle herds in the state of Rio de Janeiro. Fecal samples were collected from 94 dairy cattle in 9 family-based rural properties in the cities of Aperibé, Campos dos Goytacazes, Itaboraí, Itaocara and Sampaio Correia, located in different regions of the state of Rio de Janeiro, in the period of September 2013 to August 2014. Samples were obtained from animals of varying age (between 3 days and 10 months) and classified as diarrheal or non-diarrheal according to the consistency and appearance of the stool. Viral detection was performed by RT-PCR using specific primers that amplify a portion of the gene that encodes the VP6 protein of each of the species studied. Twenty-six (27.7%) were positive for at least one of the species studied: 22 (23.4%) samples were positive only for BoRVA; 3 (3.2%) were positive for BoRVC and one sample (1.1%) had co-infection of BoRVA and BoRVC. The presence of RVB was not detected. Seven (21.9%; n = 32) animals with diarrhea and 19 (30.1% n = 62) of the asymptomatic animals were positive, with no significant difference in positivity (p = 0.3677) (Table 2). BoRV was detected in all properties studied, at a frequency between 14.3% and 80%, demonstrating the widespread circulation of the virus in four of the seven regions of the state of Rio de Janeiro. Infection was more frequent among animals ≤6 months of age. Sequence analysis of a portion of VP6 identified the I2 genotype. The results obtained in this study demonstrated the circulation of BoRV in all the cities surveyed, covering 4 of the 7 regions of the state of Rio de Janeiro. Considering the high frequency of BoRV infection found, it is possible to speculate that this pathogen may be widely disseminated in the state's cattle herd. The presence of BoRVC was also demonstrated

in the state's cattle herd, which is the first description of this agent in cattle in the country. Thus, the data presented here are relevant and should contribute to improve knowledge about the importance and dissemination of BoRV in the national territory and assist in the planning and implementation of control and prevention measures for bovine rotavirus in Brazil.

Keywords: Rotavirus; Cattle; Viral diarrhea; Epidemiology

Resumo para pessoas leigas

Adrielle Rodrigues Moreira Miranda

Detecção de rotavírus da espécies *A*, *B* e *C* em bovinos no Rio de Janeiro

Orientador: Gabriella Mendes

Resumo para pessoas leigas da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Em um país com atividade predominantemente agropecuária a manutenção de rebanhos tem grande importância nacional, já que a mesma tem impacto direto sobre a economia, pois representa um valor significativo no PIB, 10% do PIB em 2020, diante disso é necessário que haja cuidados no manejo do rebanho para se evitar perdas econômicas provenientes de doenças dos animais, que uma vez instaladas causam danos à saúde dos animais, tem difícil controle em rebanhos muito grandes, causam baixo desenvolvimento metabólico levando a baixa produção em gado leiteiro e óbito precoce destes animais infectados. Os agentes causadores de doenças nos rebanhos podem ser diversos, bactérias, vírus e protozoários podem causar uma diversidade de males nesses animais, dentre esses se destaca a doença diarreica que ocorre frequentemente, e entre os causadores dessa doença se destaca o rotavírus, um gênero de vírus, que já foi detectado em humanos e em diversas espécies de mamíferos e aves, esse vírus se espalha para outros hospedeiros através da ingestão de água ou alimentos contaminadas com fezes de animais infectados. Para que haja ações de prevenção e controle dessas infecções, como produção de vacinas, é necessário monitorar a circulação e as características desses vírus entre a população. Dessa forma, para monitorar a circulação desses vírus, o projeto age realizando testes para detectar a presença de Rotavírus em amostras de fezes de animais doentes e não doentes, e o que se observa é a presença dele nos animais dos dois grupos (doentes e não doentes), levando a conclusão de que esses animais não doentes são transmissores do vírus, pois o animal permanece junto do rebanho e conseqüentemente o vírus também.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Balanço da pecuária brasileira em 2020.....	2
Figura 2. Representação esquemática da estrutura da partícula de rotavírus.....	5
Figura 3. Microscopia eletrônica da partícula de rotavírus.....	5
Figura 4. Localização dos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras fecais de bovinos.....	19
Figura 5. Procedimento de coleta das amostras fecais de bovinos.....	20
Figura 6. Positividade quanto às amostras de rotavírus detectadas.....	27
Figura 7. Distribuição etária das amostras positivas para BoRV.....	32
Figura 8. Dendrograma construído a partir das sequências parciais de 209 bp da VP6 de estirpes de BoRVA.....	33

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.	Relação dos municípios, propriedades rurais, período de coleta e números de amostras fecais de bovinos coletadas.....	18
Tabela 2.	Resultado da análise das amostras fecais de bovinos para a detecção de rotavírus.....	29
Tabela 3.	Frequência das infecções por rotavírus nos municípios estudados.....	30
Tabela 4.	Distribuição de amostras positivas quanto a espécie de rotavírus detectada.....	31
Quadro 1.	Iniciadores que foram utilizados nas reações de RT-PCR e <i>seminested</i> PCR para detecção de RVA, RVB e RVC	24
Quadro 2.	Ciclos da PCR e <i>seminested</i> PCR.....	25

Índice

Resumo	vi
Abstract	viii
Resumo para pessoas leigas	x
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas e Quadros	xii
1. Introdução	1
1.2. Rotavírus.....	3
1.2.1. Histórico.....	3
1.2.2. Propriedades gerais dos rotavírus.....	4
1.2.3. Rotavírus de Bovinos.....	5
1.2.3.1. Patogênese da infecção e manifestações clínicas.....	6
1.2.3.2. Epidemiologia dos BoRV.....	8
1.2.4. Prevenção e controle.....	10
2. Justificativa	14
3. Objetivos	15
3.1. Objetivos gerais.....	15
3.2. Objetivos Específicos.....	15
4. Material e Métodos	16
4.1. Questões éticas.....	16
4.2. Desenho do estudo.....	16
4.3. Amostras fecais.....	16
4.4. Processamento das amostras fecais.....	21
4.5. Extração do RNA viral.....	21
4.6. Controles.....	22
4.7. Pesquisa viral por RT-PCR.....	22
4.7.1. Produção do cDNA viral.....	22
4.7.2. Amplificação por PCR.....	23
4.7.3. Eletroforese em gel de agarose.....	23
4.8. Sequenciamento dos produtos amplificados.....	25
4.8.1. Análise das sequências.....	25

4.9. Análise estatística.....	26
5. Resultados.....	27
5.1. Detecção de infecções por RV.....	27
5.2. Sequenciamento das amostras positivas.....	32
6. Discussão.....	34
7. Conclusões.....	39
8. Referências bibliográficas.....	40

1. Introdução

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário econômico mundial. As atividades deste setor possuem forte representatividade na geração de divisas para o país e impactam diretamente no saldo da balança comercial (ABIEC, 2021).

Estima-se que em 2020, a produção mundial de carne foi de 337,3 milhões de toneladas. Nesta atividade, dentre os subsetores de carne, destaca-se a carne vermelha (bovinos e bubalinos), que produziu 71,4 milhões de toneladas. Esse volume é devido principalmente aos maiores produtores de carne bovina: Estados Unidos, Brasil, União Europeia, China e Argentina. Entre esses, o Brasil se posiciona como o segundo maior produtor, e maior exportador produzindo cerca de 10 milhões toneladas e exportando cerca de duas mil toneladas anualmente (FAO, 2021).

O rebanho brasileiro possui 187,55 milhões de cabeças de gado, distribuídos em uma área de 165,2 milhões de hectares. Cerca de 20% (44 milhões de cabeças) desses animais estão destinados ao abate, gerando aproximadamente 10 mil toneladas de carne, das quais 26,7% foram exportadas e 73,9% foram destinadas ao mercado interno, este que tem um consumo per capita de 36,39 kg/ano (ABIEC, 2021) (Figura 1). Já em relação à produção de leite em 2020 foi produzido um total de 25,23 bilhões de litros de leite, um aumento de 2,8% em relação a 2019, esse volume é também um recorde de produção de leite no Brasil. Essa produção tem como destino o mercado interno, sendo somente 0,4% (100,65 milhões de litros) destinados à exportação (EMBRAPA, 2020).

Desta forma, a atividade pecuária tem grande relevância no cenário econômico brasileiro, apenas em 2020 o produto interno bruto (PIB) da pecuária movimentou R\$ 747,05 bilhões, representando 10% do PIB total (ABIEC, 2021).

À vista disso, é importante que haja um controle sanitário dos rebanhos visando a eficiência reprodutiva e produtiva, pois condições sanitárias inadequadas facilitam o surgimento e disseminação de doenças, que são causadas por diferentes agentes, como bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Nesse cenário, os bezerros são os mais afetados, pois são mais suscetíveis às doenças, sendo a categoria que mais sofre sequelas e tem maior número de mortes (Geletu, Usmael e Bari, 2021).

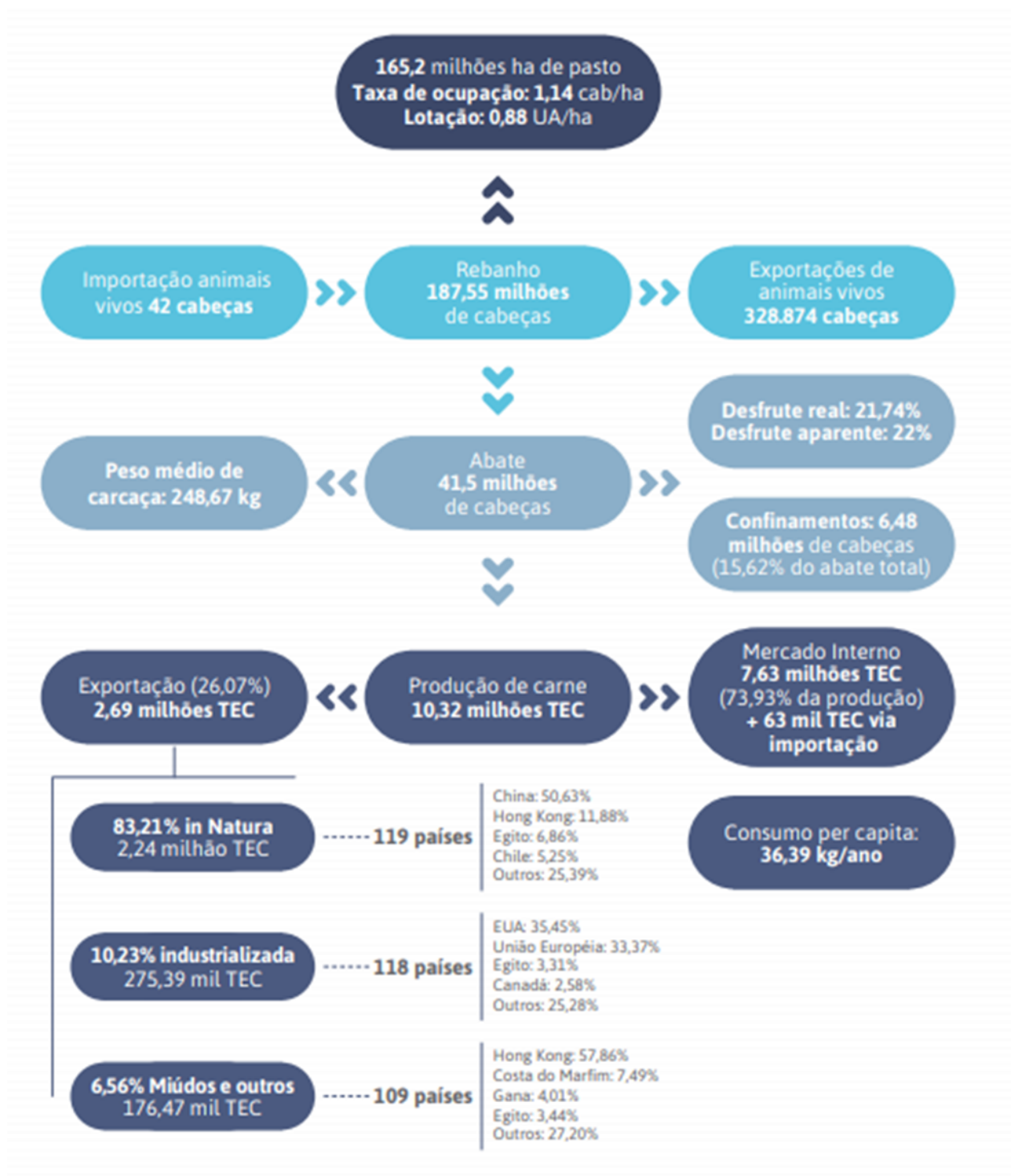


Figura 1. Balanço da pecuária brasileira em 2020. TEC = Toneladas Equivalente Carcaça. O Brasil hoje pode atender qualquer mercado no mundo, sejam nichos específicos com carnes mais nobres (carne gourmet ou culinária) até cortes de menor valor (carne ingrediente), sejam mais magras ou com maior teor de gordura, sob qualquer demanda de volume.
Fonte: ABIEC, 2021.

Dentre as doenças que acometem o gado, a gastroenterite é uma das mais importantes, afetando principalmente animais jovens, podendo causar grandes perdas econômicas para os

produtores. Tais perdas econômicas são decorrentes do gasto com o tratamento e manejo dos animais doentes, baixo desenvolvimento metabólico, levando a um maior tempo para crescimento do animal, atraso da idade ao primeiro parto além da mortalidade (Gomez e Weese, 2017; Geletu, Usmael e Bari, 2021).

As gastroenterites são caracterizadas por perda de água e eletrólitos, levando a desidratação, que dependendo do grau pode ocasionar desde perda de peso até mesmo a morte do animal (Abe *et al.*, 2009). Outros sintomas como febre, fraqueza, depressão, perda de apetite e conseqüentemente emagrecimento progressivo também são frequentemente observados. Entre os principais agentes causadores de gastroenterites estão bactérias (*Escherichia coli*, *Salmonella sp.*, *Clostridium perfringens*), vírus (rotavírus e coronavírus) e protozoários (*Eimeria sp*) (Dhama *et al.*, 2009; Foster e Smith, 2009; Cho e Yoon, 2014; Gomez e Weese, 2017).

Entre esses agentes, os rotavírus contribuem significativamente para a enterite e diarreia em bezerros neonatos criados intensivamente. A doença é geralmente vista em bezerros jovens de 2 a 8 semanas de idade e a suscetibilidade diminui com o avanço da idade, muito provavelmente devido a mudanças na fisiologia animal e/ou imunidade adquirida devido a exposições anteriores (Dhama *et al.*, 2009; Papp *et al.*, 2013; Geletu, Usmael e Bari, 2021).

1.2. Rotavírus

1.2.1. Histórico

A primeira descrição da infecção por rotavírus (RV) em bovinos ocorreu em 1969, quando Mebus e colaboradores induziram diarreia em bezerros privados de colostro, inoculando fezes ou filtrados livres de bactérias. A microscopia eletrônica das fezes de um bezerro com diarreia revelou a presença de partículas virais com um diâmetro de aproximadamente 65 nm (Mebus *et al.*, 1969). Este vírus, inicialmente denominado reovírus-*like*, foi subseqüentemente identificado como RV, e quatro anos depois foi identificado como sendo responsável por diarreia grave em crianças (Bishop *et al.*, 1973). Anteriormente, o vírus já havia sido descrito em murinos (Adams e Kraft, 1963) e símios

(Malherbe e Strickland-Chomley, 1967) com quadro de diarreia grave. Desde então, os RV têm sido associados à diarreia em quase todas as espécies de mamíferos jovens, incluindo quirópteros (Estes e Greenberg, 2013; Sadiq *et al.*, 2018) além de aves (Dhama *et al.*, 2005).

1.2.2. Propriedades gerais dos rotavírus

Os RV são pertencentes à família *Reoviridae*, subfamília *Sedoreovirinae*, gênero *Rotavirus*. A partícula viral não apresenta envelope lipídico, entretanto o genoma encontra-se envolvido por uma tripla camada proteica de simetria icosaédrica, que forma o capsídeo (Estes e Greenberg, 2013) (Figuras 2 e 3). O seu genoma é composto por 11 segmentos de ácido ribonucleico (RNA, do inglês *ribonucleic acid*) de fita dupla (RNA fd) monocistrônicos, com exceção do segmento 11 que codifica duas proteínas. São codificadas seis proteínas estruturais (VP, do inglês *viral protein*), VP1-VP4, VP6 e VP7 e cinco ou seis proteínas não estruturais (NSP, do inglês *non structural protein*), NSP1-NSP5/6, dependendo da espécie viral (Ruiz *et al.*, 2009).

Os RV são classificados em 12 espécies denominadas de *A-L* (Matthijnssens *et al.*, 2012; Mihalov-Kovács *et al.*, 2015; Bányai *et al.*, 2017; Johne *et al.*, 2019) determinadas a partir de características genômicas da proteína VP6. Os RV das espécies *A*, *B*, *C* e *H* (RVA, RVB, RVC e RVH) infectam tanto seres humanos quanto animais, enquanto os RV das espécies *D*, *E*, *F* e *G* (RVD, RVE, RVF e RVG, respectivamente) até o momento, somente foram detectados em animais, particularmente em aves (Matthijnssens, Martella e van Ranst, 2010). Os RV da espécie *I* (RVI) foram descritos em caninos (Mihalov-Kovács *et al.*, 2015) e a espécie *J* (RVJ) foi descrita em morcegos (Bányai *et al.*, 2017). Recentemente, dois candidatos a novas espécies foram descritos em musaranhos (Espécies *K* e *L*) (Johne *et al.*, 2019). Em bovinos, até o momento, já foram descritas infecções por RVA, RVB e RVC (Dhama *et al.*, 2009; Papp *et al.*, 2013; Geletu, Usmael e Bari, 2021).

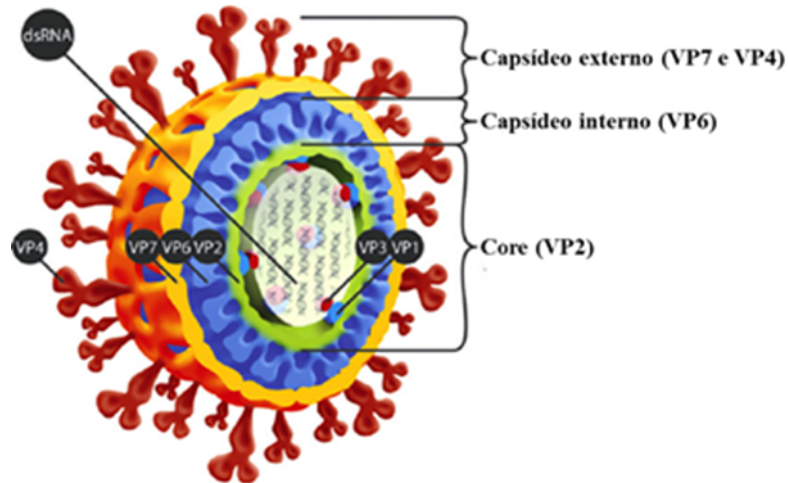


Figura 2. Representação esquemática da estrutura da partícula de rotavírus. A partícula é formada de três camadas concêntricas de proteína: a camada mais externa ou capsídeo externo, formada pelas VP4 (espícula viral, em vermelho) e VP7 (amarelo), a camada intermediária ou capsídeo interno, formada pela proteína VP6 (azul) e a camada interna ou core, formada pela VP2 (verde). Os segmentos de RNA de fita dupla (RNAfd) (cinza) são empacotados dentro do core em associação com o complexo das enzimas virais: VP1 (RNA polimerase-RNA dependente) (azul) e VP3 (metiltransferase/guanililtransferase) (vermelho).
Fonte: Adaptado de Usonis *et al.*, 2012

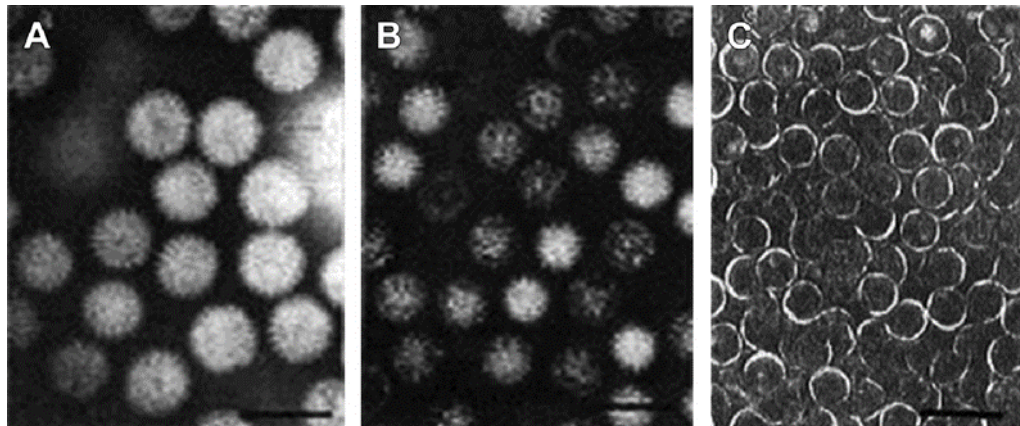


Figura 3. Microscopia eletrônica da partícula de rotavírus. (A) Partícula infecciosa completa, com a tripla camada proteica. (B) Partícula com dupla camada proteica. (C) Partícula com apenas o core.
Fonte: Estes e Kapikian, 2007.

1.2.3. Rotavírus de Bovinos

Os RV que infectam bovinos (BoRV) causam diarreia, muitas vezes grave e fatal. Os BoRV induzem diarreia em bezerros neonatos que foram expostos a leite, água e alimentos contaminados com vírus. Bezerros jovens, especialmente com idade de 1-3 semanas, são mais vulneráveis à infecção e a taxa de infecção diminui com o aumento da idade; bezerros com mais de 3 meses de idade geralmente não são afetados. A dose infecciosa é baixa (~ 10 partículas); e o vírus é eliminado em grandes quantidades (~ 10^{11} partículas por grama de fezes) antes do início dos sintomas e por várias semanas depois (McNulty, 1983; Geletu, Usmael e Bari, 2021). Portanto, a contaminação ambiental, ainda que mínima, pode causar infecção generalizada no rebanho. Além disso, a agregação de bezerros pode acelerar a transmissão por contato direto e as vacas podem excretar vírus nas fezes durante os estágios finais da gestação, fornecendo assim uma fonte de infecção para seus descendentes (Dhama *et al.*, 2009). Contudo, foi sugerido que o principal modo de espalhamento do vírus no rebanho é de bezerros infectados para outros suscetíveis sendo os animais adultos a principal fonte de infecção em animais recém-nascidos. Pesquisas sorológicas revelaram que 50–100% dos animais adultos podem apresentar resposta imunológica contra RVA (Geletu, Usmael e Bari, 2021).

1.2.3.1. Patogênese da infecção e manifestações clínicas

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da infecção por BoRV são melhor compreendidos para os BoRV da espécie *A* (BoRVA). Dessa forma, as informações que serão apresentadas a seguir, são concernentes às infecções causadas por essa espécie.

Os BoRVA são agentes enteropatogênicos mais comumente associados à diarreia neonatal em bezerros com até 30 dias de idade. O mecanismo da diarreia induzida por RV não é completamente conhecido. Contudo, o principal mecanismo parece ser a absorção diminuída de sal e água relacionada à infecção seletiva das células vilosas intestinais absorptivas, resultando em secreção de fluidos. O principal local de infecção são as células epiteliais das vilosidades no intestino delgado. As células infectadas são rapidamente substituídas por células indiferenciadas da cripta, resultando na redução da atividade da lactase nas vilosidades (Geletu, Usmael e Bari, 2021).

Após a ingestão, as partículas virais infectam exclusivamente os enterócitos diferenciados maduros na parte média e superior das vilosidades do intestino delgado, levando a alterações estruturais no epitélio intestinal (Lundgren e Svensson, 2001). O vírus é sintetizado no citoplasma dos enterócitos maduros absorptivos e produtores de enzimas, das vilosidades do intestino delgado. A destruição de enterócitos nas vilosidades leva à ruptura e descamação dessas células com liberação de novas partículas virais que irão infectar as células adjacentes. O RV não infecta nem as células imaturas da cripta vilosa nem os enterócitos do cólon (Geletu, Usmael e Bari, 2021).

O RV pode causar diarreia por três mecanismos diferentes. Primeiro, dentro de 12–24 horas após a infecção, os enterócitos estão intactos, mas os níveis de dissacaridases (sacarase, maltase e lactase) estão bastante reduzidos. Como resultado, os dissacarídeos da dieta não podem ser hidrolisados em monossacarídeos e, portanto, não podem ser absorvidos, levando à diarreia osmótica (Anderson e Weber, 2004). Em segundo lugar, a NSP4 tem um efeito na abertura dos canais de cálcio nos enterócitos. Isso causa um efluxo de sódio e água, produzindo diarreia secretora (Jayaram, Estes e Prasad, 2004). Finalmente, a maior concentração de cálcio intraenterócito faz com que os enterócitos morram por oncose. A taxa de morte dos enterócitos vilosos maduros excede a taxa de crescimento dos enterócitos imaturos que são regenerados a partir das células-tronco na cripta, causando embotamento das vilosidades e, portanto, má absorção (Anderson e Weber, 2004). A infecção se resolve quando não estão mais disponíveis enterócitos maduros suscetíveis e uma resposta imune é gerada (Lundgren e Svensson, 2001). O vômito, que é um sinal frequente na rotavirose, é causado pela serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT). A 5-HT é secretada por células enterocromafins (EC) que podem ser infectadas diretamente por RV. A 5-HT ativa os nervos aferentes vagais conectados ao núcleo do trato solitário e área posterior nas estruturas do tronco encefálico associadas a náuseas e vômitos (Hagbom *et al.*, 2011).

A diarreia por BoRV se apresenta como uma doença aguda com período de incubação muito curto de 12–24 horas ou às vezes variando de 18–96 horas. Geralmente é uma doença não febril, a menos que complicada por patógenos secundários (Geletu, Usmael e Bari, 2021). Em geral, a diarreia tem duração de 4 a 8 dias. A maioria das infecções são leves e autolimitadas, embora geralmente haja alta morbidade. Variações na doença clínica observada em bezerros dependem de uma série de fatores, incluindo diferença na virulência entre

estirpes virais, idade e estado imunológico do hospedeiro, dose do inóculo, ocorrência de coinfeções, estresse ambiental (condições climáticas, alojamento, superlotação) e nutrição, além de consequências sistêmicas de desequilíbrios eletrolíticos, perda de fluidos e acidose metabólica, anorexia, diarreia aquosa profusa e vários graus de desidratação sistêmica. Em casos graves, a morte ocorre como resultado de desequilíbrios eletrolíticos, desidratação e parada cardíaca (Dhama *et al.*, 2009; Geletu, Usmael e Bari, 2021). Em bezerros neonatos, a taxa de mortalidade por rotavírus pode chegar a 80%, mas a maioria dos relatos sugere que seja em torno de 5 a 20%. No entanto, a mortalidade pode ser maior em bezerros, que receberam quantidade insuficiente de colostro e estão sob condições de estresse (Dhama *et al.*, 2009).

1.2.3.2. Epidemiologia dos BoRV

As infecções por BoRV são amplamente disseminadas na natureza e causam diarreia em bovinos jovens sendo o RVA responsável pela maioria das infecções (Dhama *et al.*, 2009; Gomes e Weese, 2017; Geletu, Usmael e Bari, 2021). O BoRV constitui um sério problema de sanidade bovina, podendo causar perdas econômicas devido à mortalidade, custos de tratamento e baixo crescimento. O BoRV é altamente infeccioso porque (1) as partículas virais estão presentes em grande número nas fezes infectadas e (2) o vírus é resistente à inativação e pode permanecer infeccioso por, pelo menos, 9 meses em temperatura ambiente ou por 1 h a 60 °C (Geletu, Usmael e Bari, 2021). O vírus permanece infeccioso nas fezes por vários meses em currais e celeiros; e a resistência a muitos desinfetantes, contribui para a persistência da infecção (Chauhan e Singh 1996).

Além disso, as infecções por RV têm uma epidemiologia complexa devido à co-circulação de diferentes genótipos do vírus em uma área geográfica, principalmente devido ao *shift* genético ou reagrupamentos genômicos. Foi sugerido que, no ambiente, o reagrupamento de duas estirpes distintas de RV pode gerar 2^{11} progênie diferentes, o que é mais do que é observado para aos vírus da influenza aviária com apenas 8 segmentos genômicos (Desselberger, Gray e Estes, 2005; Dhama *et al.* 2005). Além disso, muitos pesquisadores descreveram a incidência e prevalência da infecção em bezerros variando de 7 a 98%, embora a taxa média deva ser considerada como 30 a 40% (Dhama *et al.*, 2009).

A diversidade das estirpes de RVA é potencializada principalmente pelo acúmulo de mutações pontuais que levam à deriva genética/antigênica e reagrupamento de genes cognatos que levam a alterações genéticas e/ou antigênicas (Matthijnsens e Desselberger, 2012). Um importante mecanismo evolutivo adicional é a transmissão interespecíes, que ocorre quando uma estirpe de RVA é capaz de infectar uma espécie hospedeira heteróloga. Isso geralmente é associado ao reagrupamento gênico (Martella *et al.*, 2010). RVA pode ser classificado em tipos P ou G com base nas sequências nucleotídicas dos genes que codificam VP4 e VP7. A VP4 (proteína P para “sensível à protease” devido à sua clivagem mediada por tripsina necessária para a adsorção do vírus nas células) determina o genótipo P; a VP7 (proteína G para "glicoproteína" formando a matriz do capsídeo) define os genótipos G (Matthijnsens *et al.*, 2011).

Em bovinos, estirpes de RVA pertencentes a pelo menos 12 tipos G (G1 – G3, G5, G6, G8, G10, G11, G15, G17, G21 e G24) e 11 tipos P (P[1], P[3], P[5-7], P[11], P[14], P[17], P[21], P[29] e P[33]) foram identificados. Estirpes de RVA pertencentes a G6, G8 e G10, em associação com P[1], P[5] e P[11], são comumente encontradas em bovinos, embora as estirpes G1-G3, G5 e G11 e P[3], P[6], P[7] e P[14] tenham sido detectadas esporadicamente. Uma estirpe de BoRVA incomum, G17P[17] (Bo/993/83), semelhante à RV aviário, foi isolada de um bezerro, sendo este, presumivelmente, o resultado de um evento de transmissão interespecíes de uma estirpe de RVA aviária para um bovino. Além disso, estirpes de BoRVA com novos genótipos VP7 (G15, G21 e G24) e genótipos VP4 (P[21], P[29] e P[33]) foram identificadas (Matthijnsens *et al.*, 2011; Papp *et al.*, 2013).

No Brasil já foram descritas infecções por BoRVA pertencentes aos genótipos G6P[1], G6P[5], G6P[11], G8P[1], G8P[11] e G10P[11] (Caruzo *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011; Fritzen *et al.*, 2019a, 2019b e 2020; Medeiros *et al.*, 2019).

Os RVB já foram descritos como causadores de diarreia em seres humanos, aves, bovinos e suínos (McNulty *et al.*, 1981; Dimitrov *et al.*, 1983; Askaa e Block, 1984; Vonderfecht *et al.*, 1986). Em bovinos, RVB foi detectado em casos esporádicos e/ou surtos de diarreia em bezerros e animais adultos da Índia, Japão e EUA (Chinsangaram *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 1997; Tsunemitsu *et al.*, 1999; Barman *et al.*, 2004; Ghosh *et al.*, 2007). Além disso, anticorpos para BoRVB foram relatados em gado do Japão e do Reino Unido (Brown *et*

al., 1987; Tsunemitsu *et al.*, 2005). Apesar de já ter sido descrito em bovinos criados em diversos países, informações sobre sua prevalência são muito escassas, variando entre 5,6 % (Chang *et al.* 1997) e 81% (Chinsangaram *et al.*, 1995) em animais sintomáticos, sendo observada, na maioria das vezes, uma prevalência maior em bovinos adultos (Chang *et al.*, 1997; Tsunemitsu *et al.*, 1999). No Brasil, até o momento, RVC somente foi detectado em suínos (Médici *et al.*, 2010; Miyabe, *et al.*, 2020)

Os RVC foram isolados pela primeira vez em 1980, em suínos diarreicos, posteriormente foi detectado em outros hospedeiros como humanos e cães (Saif *et al.*, 1980; Rodger, Bishop e Holmes, 1982; Otto, Schulze e Herbst, 1999). A primeira detecção de RVC em bovinos foi em 1991, no Japão, em vacas adultas que apresentavam quadro de diarreia (Tsunemitsu *et al.*, 1991).

Essa espécie está amplamente distribuída no mundo, sendo detectada em diversos países na Ásia, África, América, Europa e Oceania (Peñaranda *et al.*, 1989; Sebata e Steele, 1999; Castello *et al.*, 2002; Schnagl *et al.*, 2004). Em bovinos o que se observa são quadros de diarreia principalmente em animais adultos associada à diminuição na produção de leite (Mawatari *et al.*, 2004).

No Brasil, até o momento, RVC somente foi detectado em humanos e suínos (Luchs, *et al.*, 2011; Flores *et al.*, 2021)

1.2.4. Prevenção e controle

Os vírions são estáveis em uma ampla faixa de pH e resistentes a solventes de lipídios, como o éter e o clorofórmio, podendo se manter infeccioso por um longo período nas fezes (Dhama *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2000; Alfieri *et al.*, 2012). Sua eliminação em rebanhos comerciais é muito difícil (Chang e Kim, 2012). Por esse motivo é importante usar medidas gerais na profilaxia como: isolamento dos animais infectados com o objetivo de reduzir a transmissão do vírus aos animais suscetíveis, separação dos animais por faixa etária, desinfecção de instalações e rodízio de piquetes (espaços pré-definidos e limitados na área de pastagem) de parição (Alfieri *et al.*, 2012).

No caso da bovinocultura, não há um vazio sanitário (período que o pasto fica vazio - sem animais alojados, contado desde a desinfecção até a entrada do próximo lote de animais) das instalações devido o sistema de criação ser intensivo. Porém, as instalações onde circulam os animais, as camas e a sala de ordenha devem ser mantidas limpas evitando-se o acúmulo de terra e esterco, devem estar secas e sempre conservadas em condições adequadas de uso. Esses ambientes devem ser desinfetados quinzenalmente com soluções de cresóis ou fenóis a 1%, iodofórmio a 0,05% ou com cal queimada. A ordenhadeira deve ser lavada diariamente com água quente (60°C) e detergente alcalino, e semanalmente com detergente ácido, deve-se realizar a limpeza mensal da válvula reguladora e anualmente uma limpeza geral da bomba de vácuo e mangueiras que tem contato direto com o leite (Oliveira *et al.*, 2010).

Devido à resistência das partículas virais, desinfetantes comuns, como a formalina, lisol, derivados fenólicos e peróxido de hidrogênio, devem ser utilizados com cautela, pois, dependendo da concentração e do tempo de exposição, os vírions podem manter a sua viabilidade. O hipoclorito de sódio e o etanol a 95% são os desinfetantes de eleição (Alfieri *et al.*, 2012). No entanto, a infecciosidade dos RV é perdida por ciclos repetidos de congelamento-descongelamento e tratamento com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) na concentração de 5 mM, o que remove a camada externa (Chang e Kim, 2012).

Não há tratamento específico para infecções por RV. O tratamento é baseado em cuidados de suporte e gerenciamento de sinais clínicos e potenciais complicações. A administração de fluidos é essencial para repor as perdas por diarreia ou vômito, para corrigir a acidose e restaurar o desequilíbrio eletrolítico. A concentração adequada de sódio e as proporções adequadas de glicose/sódio são os componentes mais importantes de uma solução de reidratação eficiente. Em animais jovens, a administração de fluidos pode ser realizada por meio de cateter esofágico; em animais mais velhos, a administração intravenosa é preferível (Geletu, Usmael e Bari, 2021).

A fim de diminuir a incidência da doença no rebanho, um bom produtor deve maximizar a transferência de colostro, aumentar o saneamento ambiental, reduzir fatores estressantes como superlotação ou má nutrição e vacinar vacas prenhes contra BoRV, 60 e 30 dias antes do parto (Godden, Lombard e Woolums, 2019). O colostro da primeira ordenha é uma fonte de nutrientes e de anticorpos maternos absorvidos passivamente, essenciais para

proteger o bezerro recém-nascido contra doenças infecciosas nas primeiras semanas e meses de vida. Por causa disso, qualquer esforço para prevenir a diarreia vacinando as vacas é perdido, a menos que o bezerro realmente receba o colostro, de preferência antes de completar 2 a 4 horas de vida. À medida que o bezerro envelhece, ele perde rapidamente sua capacidade de absorver anticorpos colostrais. O colostro administrado a bezerros com mais de 24 a 36 horas de vida é praticamente inútil; os anticorpos raramente são absorvidos tão tardiamente na vida. O bezerro neonato deve receber idealmente 2 a 3L (para bezerros de corte) ou 3 a 4L (para bezerros leiteiros) de colostro nas primeiras 6 horas após o nascimento (Larson *et al.*, 2004).

As vacinas comerciais anti-BoRVA são administradas por via parenteral a vacas durante o estágio final da gestação, a fim de eliciar uma forte imunidade materna que é prontamente conferida aos animais recém-nascidos. Alguns estudos demonstraram falha da vacina que foram relacionadas a uma série de fatores, incluindo condições de manejo de animais inadequadas ou diferenças antigênicas entre estirpes vacinais e estirpes circulantes de BoRVA, mesmo quando estas estirpes compartilham parcialmente suas especificidades de antígeno de superfície (Geletu, Usmael e Bari, 2021).

As vacinas anti-BoRVA têm como alvo as proteínas VP7 (G) e VP4 (P) presentes no capsídeo externo do vírus; as vacinas disponíveis atualmente utilizam vírus inativados, de estirpes que tem combinações de genótipos GxP[x], mais predominantes entre bovinos. Estão disponíveis no mercado vacinas como: Rotavec → Corona (MSD-Animal Health, Kenilworth, NJ, EUA), Bovigen → Scour (Virbac, Carros, França) e ScourGuard™ 4KC (Zoetis, Parsippany-Troy Hills, NJ, EUA). São vacinas trivalentes, que combinam BoRVA, coronavírus bovino e *Escherichia coli* F5 (K99). A vacina Rotavec → Corona utiliza estirpe dos genótipos G6P[5], a Bovigen → utiliza estirpes G6P[1] e a ScourGuard™ 4KC utiliza estirpes dos genótipos G10P[11] e G6P[1]. Essas vacinas são indicadas principalmente para vacas prenhes, com o objetivo de fornecer imunidade passiva para neonatos, através de anticorpos anti-RVA presentes no colostro, que é fundamental para a saúde e sobrevivência dos bezerros (Godden, Lombard e Woolums, 2019). As vacinas induzem títulos de anticorpos elevados por até 28 dias após o nascimento dos bezerros em vacas vacinadas até três semanas antes do parto (Crouch, Oliver e Francis, 2001; Durel *et al.*, 2017). Apesar de serem eficientes, a vacina não é de uso obrigatório (EMBRAPA, 2015). Duas formulações de

vacinas diferentes são utilizadas no Brasil: a vacina ScourGuard™ 4KC, bivalente G10P[11] e G6P[1] e a Rotavec® Corona, monovalente G6P[5], que é o genótipo mais prevalente no mundo e também no Brasil (Fritzen *et al.*, 2019).

2. *Justificativa*

Devido à grande importância da atividade pecuária na economia brasileira é crucial que haja um monitoramento do gado para a detecção de vírus patogênicos, para o entendimento da ecologia dos agentes e para o estabelecimento de políticas de prevenção. Levando desta forma a uma maior produtividade nas fazendas e, além disso, evitando prejuízos decorrentes de uma doença no animal. Dentre os vírus de importância na saúde animal os RV se destacam como um dos principais causadores de gastroenterites em seres humanos e em animais (Sadiq, *et al.*, 2018), apesar disso ainda não há monitoramento da circulação do vírus por parte dos órgãos governamentais, também não faz parte da lista de doenças de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial (MAPA, 2013) e a vacinação, embora esteja disponível, não é obrigatória (EMBRAPA, 2015).

Os RV possuem um grande potencial zoonótico, demonstrado pela detecção de estirpes que tem genótipos de origem animal em seres humanos, o que sugere a transmissão interespecie (Mukherjee *et al.*, 2009; Komoto *et al.*, 2016; Marton *et al.*, 2017; Castells *et al.*, 2020). A transmissão pode ocorrer por contato direto com animais infectados e também por água, alimentos e superfícies contaminadas, isso aliado a eventos de reagrupamento gênico podem fazer com que haja falhas vacinais (Cook *et al.*, 2004; Martella *et al.*, 2010; Dóro *et al.*, 2015), além disso a própria vacinação pode fazer pressão seletiva para o aparecimento de estirpes incomuns que fogem a cobertura vacinal (Fritzen *et al.*, 2020), desta forma a vigilância contínua das estirpes de RV circulantes nos rebanhos é fundamental.

Embora existam estudos que demonstram a circulação de RV no país os mesmos se limitam a espécie *A*, que apesar de ser a mais frequentemente encontrada (Dhama *et al.*, 2009; Papp *et al.*, 2013; Geletu, Usmael e Bari, 2021), não descarta a possibilidade das outras espécies de RV estarem circulando. Ainda não existem dados disponíveis na literatura científica sobre essas infecções no rebanho bovino do estado do Rio de Janeiro. Desta forma este trabalho irá contribuir para o monitoramento da circulação de RV, das espécies *A*, *B* e *C* em bovinos no Rio de Janeiro, ampliando o conhecimento sobre a epidemiologia dessa virose na bovinocultura nacional.

3. Objetivos

3.1. Objetivos gerais

Este estudo tem como objetivo contribuir para o monitoramento da circulação de RV, mais especificamente das espécies *A*, *B* e *C* em bovinos pertencentes ao rebanho do estado do Rio de Janeiro.

3.2. Objetivos Específicos

- Pesquisar a presença de RVA, RVB e RVC em bezerros com e sem diarreia e determinar a frequência destas infecções.
- Gerar dados epidemiológicos que avaliem a importância das diferentes espécies de RV como agentes de infecções em bovinos, no estado do Rio de Janeiro e forneçam embasamento para futuras ações de prevenção dessas viroses.

4. Material e Métodos

4.1. Questões éticas

As amostras utilizadas nesse estudo fazem parte da coleção do Laboratório de Víroses Entéricas, Respiratórias e Oculares (LAVIREO) do Departamento de Virologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Foram obtidas em um estudo conjunto realizado com a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO), cuja coleta havia sido aprovada pelo comitê de ética em pesquisas com animais (CEUA) da PESAGRO, processo nº 1/2014.

4.2. Desenho do estudo

O presente estudo foi do tipo observacional, transversal e descritivo, com a finalidade de determinar a frequência de infecções por RV das espécies *A*, *B* e *C* em bezerros de propriedades rurais de base familiar situadas no estado do Rio de Janeiro.

4.3. Amostras fecais

Foram coletadas amostras de fezes de 94 bovinos leiteiros (machos e fêmeas), em nove propriedades rurais de base familiar, localizadas em diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro (Tabela 1, Figura 4), no período de junho de 2013 a setembro de 2014. As amostras foram obtidas de animais com idade variada (entre 3 dias e 10 meses) e classificadas como diarreicas (32 amostras) ou não diarreicas (62 amostras) de acordo com a consistência e aspecto das fezes. Foram obtidas entre 4 e 15 amostras por propriedade, dependendo do tamanho do rebanho. As amostras foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais reunidos no curral de manejo, ou, com o auxílio de *swabs*, quando necessário (Figura 5). Todas as fezes foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o LAVIREO onde foram mantidas a -20° até seu processamento. Este procedimento foi realizado por veterinários treinados da PESAGRO/RJ, colaboradores deste projeto. As amostras foram coletadas ao longo de todo o ano, de acordo com o calendário de coleta agendado entre os veterinários e os produtores.

As propriedades rurais localizadas nos municípios de Aperibé e de Itaocara estão na mesma bacia leiteira, e fornecem leite para a CAPIL – Cooperativa Agropecuária de Itaocara

Ltda. Assim sendo, algumas propriedades pesquisadas ficam distribuídas em uma mesma “Linha de Leite”, podendo ter o leite de seus latões misturado num mesmo tanque de expansão, antes de ser enviado para a cooperativa.

Por se tratar de pequenas propriedades rurais, com um número reduzido de animais em cada rebanho, é comum a venda e/ou troca de bezerros e/ou bezerras, bem como de animais adultos, entre os proprietários, dependendo da época do ano (estação de seca ou estação de chuva), da escassez de pasto disponível na propriedade para alimentar os animais, e da necessidade financeira do proprietário. Muitas das propriedades não possuíam controle sanitário e dados zootécnicos e por essa razão não foi possível verificar a situação vacinal do rebanho.

Ocorre também a introdução de animais nos rebanhos adquiridos em leilões, bem como o trânsito de animais entre as propriedades em época de exposições agropecuárias, muitas vezes sem o cumprimento da apresentação do GTA (Guia de Trânsito Animal), e, geralmente, sem que o período de “quarentena” seja cumprido, antes de sua introdução no rebanho, junto aos outros animais.

Tabela 1. Relação dos municípios, propriedades rurais, período de coleta e números de amostras fecais de bovinos coletadas.

Município	Região	Propriedade *	Nº. de amostras	Data da coleta	Total
Aperibé	Noroeste	PF	4	09/2013	23
		PG	9	09/2014	
		PH	10	10/2013	
Itaocara	Noroeste	PC	13	05/2014	32
		PD	7	05/2014	
		PD	5	08/2014	
		PE	7	08/2014	
Campos de Goytacazes	Norte	PI	14	06/2013	14
Itaboraí	Metropolitana	PB	15	12/2013	15
Sampaio Corrêa/Saquarema	Lagos	PA	10	10/2013	10
Total					94

* = código de identificação das propriedades.

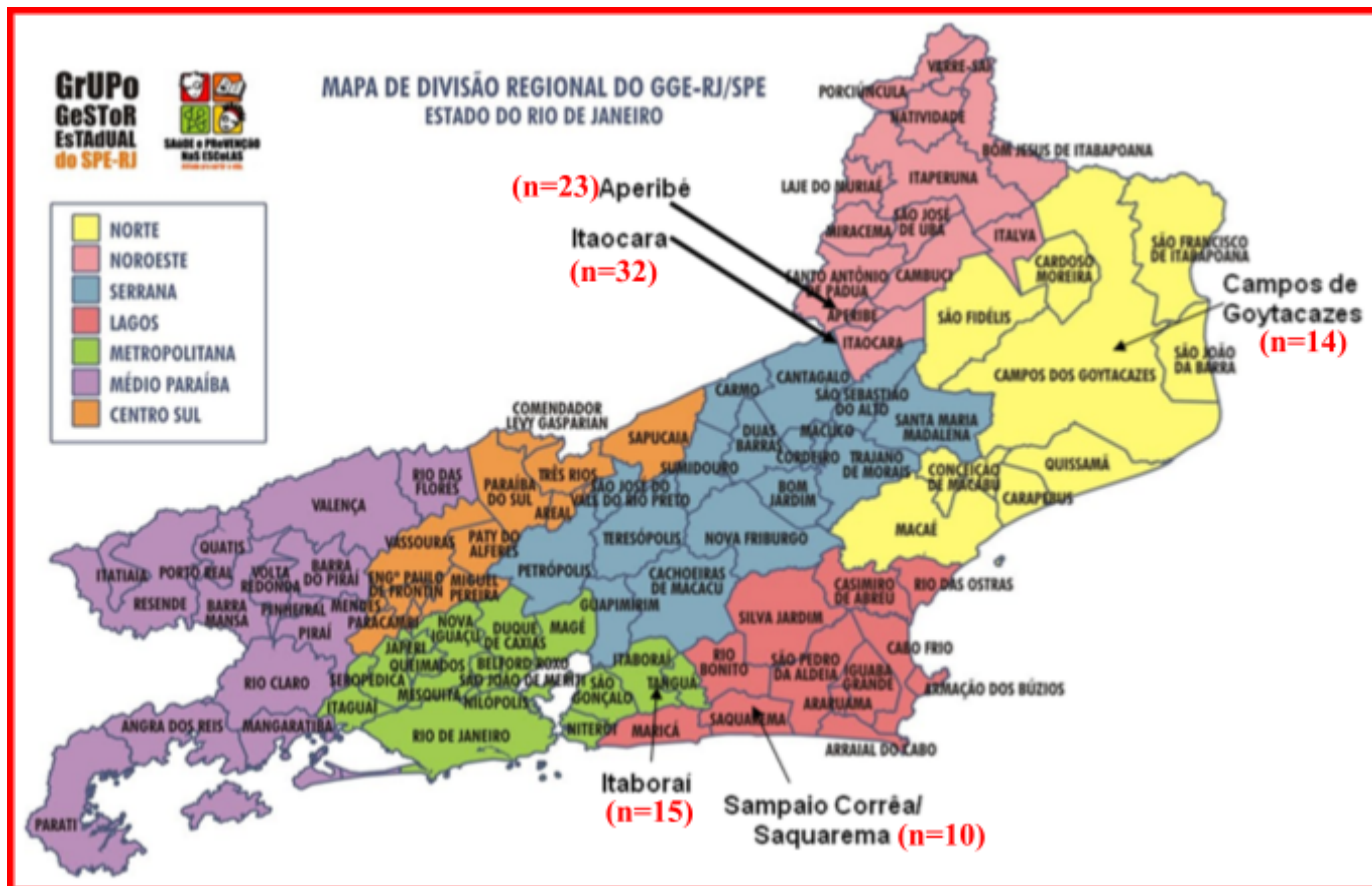


Figura 4. Localização dos municípios onde foram realizadas as coletas de amostras fecais de bovinos.

Destaque para os municípios onde foram realizadas as coletas para o presente projeto: Região Norte - Campos de Goytacazes; Região Noroeste – Aperibé e Itaocara; Região Metropolitana – Itaboraí; Região dos Lagos – Sampaio Corrêa/Squarema.

Fonte: Adaptado de <http://manchetesdoriodejaneiro.blogspot.com/2013/11/mapa-municipios-do-estado-do-rio-de.html>. Acesso em 05/10/2019.



Figura 5: Procedimento de coleta das amostras fecais de bovinos. (A) Coleta de fezes diretamente da ampola retal do animal; (B e C) Curral de manejo; (D) Aspecto das fezes diarreicas; Propriedades onde foram obtidas amostras para este estudo em Campos de Goytacazes (E) e Aperibé (F). É possível observar as instalações, bem como o estado de desnutrição que se encontram os animais. Imagens gentilmente cedidas pela veterinária responsável pelas coletas, Clarissa Varajão Cardoso.

4.4. Processamento das amostras fecais

Inicialmente, as amostras sofreram um processo de clarificação. Para tal, foram preparadas suspensões fecais a 10 – 20%, em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, em isotiocianato de guanidina (GITC, do inglês *guanidine isothiocyanate*) a 4 M (LGC Biotecnologia, Cotia, SP), para depois serem agitadas em vórtex e, em seguida submetidas à centrifugação a 10.000x g por 5 minutos. O sobrenadante foi então transferido para um tubo contendo 600 µL de álcool isopropílico (Isofar, Duque de Caxias, RJ).

Ao sedimento restante, foram novamente adicionados GITC 4 M, e o processo foi repetido. O sobrenadante foi recolhido e misturado ao sobrenadante obtido na etapa anterior e então foi centrifugado a 10.000x g por 20 min em temperatura ambiente. Após essa etapa, o álcool isopropílico foi descartado e a amostra foi suspensa em 400 µL de salina que foi utilizada para a extração do RNA viral.

4.5. Extração do RNA viral

A extração do RNA viral foi realizada por meio de um protocolo utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Em tubos contendo o clarificado fecal, preparado conforme descrito anteriormente, foram adicionados 400 µL de fenol equilibrado (Phoneutria, Belo Horizonte, MG) /clorofórmio/álcool isoamílico (Isofar) (25:24:1), a mistura foi agitada em vórtex e submetida a centrifugação a 10.000x g por 5 min em temperatura ambiente. O material ficou dividido em três fases: a orgânica (onde está o fenol e as proteínas), a fase intermediária (que também contém proteínas, mas de baixa densidade), e a fase aquosa, onde se encontra o RNA. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e foram adicionados 400 µL de fenol ácido (pH 4.5) equilibrado (Phoneutria), e agitados em vórtex. Em seguida, foram centrifugados a 10.000x g por 5 min. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e posteriormente, adicionados 600 µL de álcool isopropílico, seguido de centrifugação a 10.000x g por 20 min em temperatura ambiente. O álcool isopropílico foi descartado e então foram adicionados 1000 µL de etanol (Isofar) a 70% gelado, a mistura foi homogeneizada por inversão e, em seguida, centrifugada a 10.000x g por 10 min em temperatura ambiente. O etanol foi descartado e o resíduo restante foi evaporado a vácuo (*Speed Vacuum*

Concentrator, Thermo Fisher Scientific). Finalmente, o RNA foi suspenso em 20 µL de água destilada estéril e estocado a -70° C até o momento do uso.

4.6. Controles

Como controle positivo para RVA, foi utilizado o rotavírus de símio (SA11), isolado em cultura de células MA-104 (rim de macaco) e para RVC, uma amostra fecal suína comprovadamente positiva para este vírus gentilmente cedida pelo Dr. Amauri Alfieri da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Para o RVB, não foi utilizado controle positivo. Como controle negativo foi utilizado água.

4.7. Pesquisa viral por RT-PCR

Para a pesquisa das diferentes espécies de RV estudadas foi utilizada a metodologia de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR, do inglês *reverse transcription - polymerase chain reaction*) convencional.

4.7.1. Produção do cDNA viral

Primeiramente foi realizada uma reação de transcrição reversa (RT) para a produção do cDNA (DNA complementar) viral utilizando oligonucleotídeos randômicos. Para tal, foi adicionado em um tubo de PCR 20 µL do RNA extraído e aquecido a 97 °C por 5 min. Após este período, a suspensão foi refrigerada por 5 min a 4 °C e adicionado 20 µL da seguinte mistura: 0,8 µL de água estéril; 2 µL da mistura de desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP, Thermo Fisher Scientific) (contendo 10 mM de desoxiadenosina trifosfato [dATP], desoxitimina trifosfato [dTTP], desoxicidina trifosfato [dCTP] e desoxiguanosina trifosfato [dGTP]; concentração final 500 nM;); 8 µL de tampão da enzima concentrado 5 X; 2,4 µL de solução de cloreto de magnésio (Promega, Madison, EUA) (50 mM; concentração final 3 mM), 6 µL da solução de iniciadores (3,33 µM; concentração final 500 nM) e 0,8 µL da enzima transcriptase reversa (*ImProm-II Reverse Transcriptase*, Promega) (concentração final 10 U).

As reações foram realizadas em termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific), em uma temperatura inicial de 25 °C por 5 min, seguida de uma

temperatura de 42 °C por 45 min. Os cDNAs obtidos foram submetidos à reação de PCR como descrito a seguir.

4.7.2. Amplificação por PCR

As amostras foram submetidas à PCR e *seminested* PCR utilizando oligonucleotídeos previamente descritos, específicos para o gene que codifica a proteína VP6 dos RVA, RVB e RVC (**Quadro 1**), separadamente para cada vírus pesquisado.

Para as PCR foram adicionados os 5 µL do cDNA produzido como descrito anteriormente, 20 µL da seguinte mistura: 12,8 µL de água destilada estéril; 5 µL de tampão da enzima concentrado 5 X (*Gotaq Green Buffer*, Promega); 1 µL de solução de cloreto de magnésio (Ludwig Biotec, Porto Alegre, RS) (50 mM; concentração final 2 mM); 0,5 µL da mistura de dNTPs (10 mM; concentração final 0,2 mM); 0,5 µL da solução contendo os iniciadores senso e antisenso específicos (20 µM; concentração final 400 nM) e 0,2 µL (2 U) da enzima Taq polimerase (Ludwig Biotec).

Na *seminested* PCR foram utilizados 5 µL do produto da primeira PCR os quais foram adicionados de 20 µL da mesma mistura de PCR. As amplificações foram realizadas em termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler*. As condições da PCR e *seminested* PCR para cada uma das espécies pesquisadas estão apresentadas no **Quadro 2**.

4.7.3. Eletroforese em gel de agarose

A análise dos resultados das reações de PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose. Ao gel de agarose a 1,2% em TBE 0,5 X (Tris 0,089 M; ácido bórico 0,0089 M; EDTA 0,025 M, pH 8,3) acrescido de 5 µL de brometo de etídio (0,5 µg/µL), foram aplicados 5 µL do produto da PCR ou da *seminested* PCR e em seguida foi realizada a eletroforese a 120V por 1 hora com tampão TBE 0,5 X.

Por fim, os géis foram visualizados em um transiluminador com luz ultravioleta e fotografados com câmera digital. O tamanho do fragmento amplificado foi estimado por comparação com um padrão de tamanho molecular 100 pares de base (pb) (Ludwig Biotec).

Quadro 1. Iniciadores que foram utilizados nas reações de RT-PCR e *seminested* PCR para detecção de RVA, RVB e RVC.

Iniciador	Sentido	Sequência 5'→3'	Gene	Posição (nt) ¹	Tamanho do fragmento (pb) ²	Referência
<u>RVA</u>						
VP6-Fdeg	Senso	CTA CDT GGT ATT TYA AYC CAG T	VP6	757-778	370	Rojas <i>et al.</i> , 2016
VP6R	Antissenso	GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG		1106 - 1126		Iturriza-Gómarra <i>et al.</i> , 2002
VP6-F1deg	Senso	TKA GAC CAC CAA AYA TGA CRC CMG	VP6	907-930	220	Rojas <i>et al.</i> , 2016
VP6R	Antissenso	GTC CAA TTC ATN CCT GGT GG		1106 - 1126		Iturriza-Gómarra <i>et al.</i> , 2002
<u>RVB</u>						
B1	Senso	CTA TTC AGT GTG TCG TGA GAG G	VP6	18-39	489	Gouvea <i>et al.</i> , 1991
B4	Antissenso	CGT GGC TTT GGA AAA TTC TTG		485-506		
B1	Senso	CTA TTC AGT GTG TCG TGA GAG G	VP6	18-39	434	
B3	Antissenso	CGA AGC GGG CTA GCT TGT CTG C		429-451		
<u>RVC</u>						
C1	Senso	CTC GAT GCT ACT ACA GAA TCA G	VP6	994-1015	356	Gouvea <i>et al.</i> , 1991
C4	Antissenso	AGC CAC ATA GTT CAC ATT TCA TCC		1326-1349		
C1	Senso	CTC GAT GCT ACT ACA GAA TCA G	VP6	994-1015	327	
C3	Antissenso	GGG ATC ATC CAC GTC ATG CG		1301-1320		

¹ nt = nucleotídeo; ² pb = pares de base

Quadro 2. Ciclos da PCR e *seminested* PCR.

Etapa	RT	1ºPCR	<i>Seminested</i> PCR
Desnaturação	97 °C/5 min	94 °C/5 min	94 °C/ 3 min
Ciclo	42°C/45 min	94 °C/ 40 seg 40 °C/ 40 seg x40 72 °C/1 min 20 seg	94 °C/ 40 seg 45 °C/ 40 seg x40 72 °C/1 min
Extensão	---x---	72 °C/5 min	72 °C/5 min

4.8. Sequenciamento dos produtos amplificados

Amostras positivas de BoRVA foram submetidas ao sequenciamento do produto amplificado para identificação do genótipo I (VP6). Os produtos foram enviados para a Macrogen Inc. (Seoul, Coreia do Sul) onde foram sequenciados de acordo com o protocolo da empresa.

4.8.1. Análise das sequências

As sequências nucleotídica obtidas foram editadas e analisadas, utilizando os programas BLAST (www.ncbi.nlm.gov/BLAST), *Chromas* versão 2.4.1 (Technelysium Pty Ltd, Helensvale, QLD – Austrália) e SeqMan, EditSeq e MegaAlign do pacote do *software* Lasergene versão 7.0 (DNASTAR Inc.) e alinhadas com sequências correspondentes obtidas do *GenBank*.

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando o programa MEGA *software* v.7.0.14 (Kumar, Stecher e Tamura, 2016). As distâncias foram corrigidas usando o modelo *Kimura 2-parameter*. Os dendrogramas foram construídos pelo método de máxima verossimilhança. A significância estatística foi estimada pela análise de *bootstrap* com 1000 pseudoreplicatas.

4.9. Análise estatística

As análises estatísticas foram efetuadas utilizando teste de associação por X^2 . A significância estatística foi definida por p-valor $<0,05$.

5. Resultados

5.1. Detecção de infecções por RV

Foram coletadas amostras de fezes de 94 bovinos, pertencentes a nove propriedades rurais de base familiar, em cinco municípios do estado do Rio de Janeiro, no período de junho de 2013 a agosto de 2014, as quais foram testadas para detecção de RV. As amostras foram classificadas como diarreicas (32 amostras) ou não diarreicas (62 amostras) de acordo com a consistência das fezes. No total, 27,7% (26/94) das amostras testadas foram positivas para RV. Vinte e duas (23,4%) amostras foram positivas somente para BoRVA; 3 (3,2%) positivas para BoRVC e uma amostra (1,1%) apresentou coinfeção de BoRVA e BoRVC. Não foi detectada a presença de RVB (Figura 6).

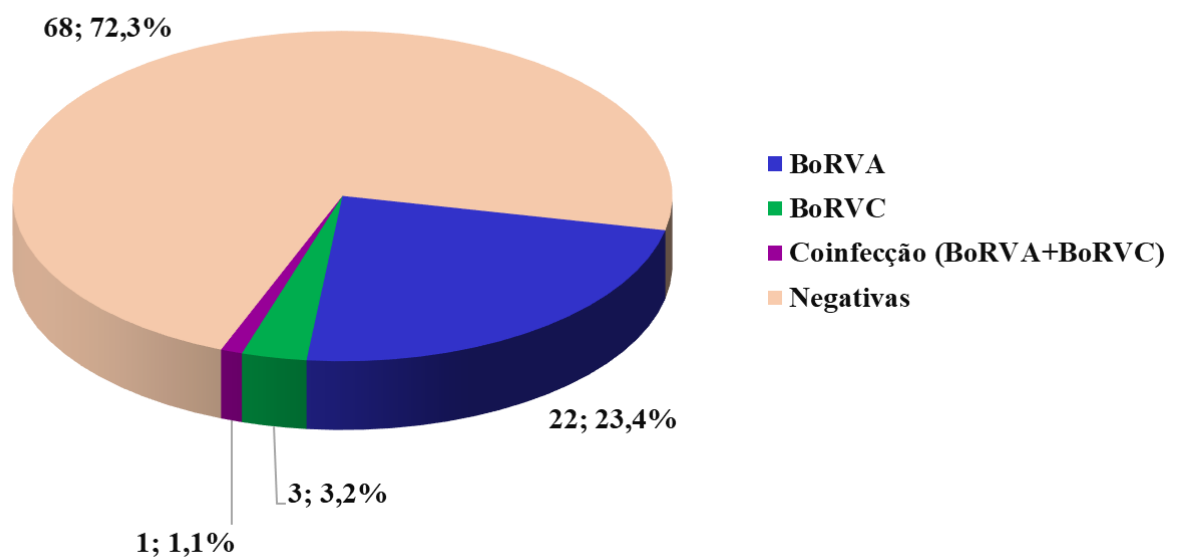


Figura 6. Positividade quanto às amostras de rotavírus detectadas.

Das 94 amostras testadas 26 (27,7 %) foram positivas para pelo menos uma das espécies pesquisadas. BoRVA foi detectado na maioria das amostras positivas (n=22; 23,4%); BoRVC foi detectado em 3,2% (n=3) amostras e coinfeção entre BoRVA e BoRVC foi detectada em uma (1,1%) amostras. Não foi detectada a presença de BoRVB. BoRVA = rotavírus de bovino da espécie A; RVB = rotavírus de bovino da espécie B; RVC = rotavírus de bovino da espécie C.

Sete (21,9%; n = 32) animais com quadros de diarreia e 19 (30,1% n = 62) dos animais assintomáticos foram positivos, não sendo observada diferença significativa na positividade ($p = 0,3677$) (Tabela 2). O BoRV foi detectado em todas as propriedades estudadas, em uma frequência entre 14,3% e 80%, demonstrando a ampla circulação do vírus em quatro das sete regiões do estado do Rio de Janeiro (região Norte, região Noroeste, região Metropolitana e região dos Lagos) (Tabela 3).

Ao analisarmos a circulação viral separadamente em cada município, observamos que: (i) nos municípios da região Noroeste, Aperibé e Itaocara, a frequência das infecções foi de 21,7% e 25%, respectivamente; (ii) em Sampaio Corrêa/Saquarema, região dos Lagos, foi observada a maior taxa de detecção viral, 80%; (iii) no município de Itaboraí na região Metropolitana, 20% dos animais testados estavam infectados pelo RV e (iv) o município de Campos de Goytacazes no Norte do estado, apresentou uma frequência de infecção viral de 14,3% (Tabela 3); (v) BoRVA foi detectado em todos os municípios enquanto BoRVC foi detectado somente em Itaboraí e Itaocara. Uma coinfeção (BoRVA+BoRVC) foi detectada em Itaocara (Tabela 4).

Entre 56 animais para os quais foi informada a idade, 48 tinham ≤ 6 meses e 33,3% (16/48) destes apresentavam a infecção por BoRV, três dos quais estavam apresentando diarreia no momento da obtenção da amostra; dos oito animais mais velhos (7 a 10 meses de idade) quatro (50%) estavam infectados e não apresentavam sintomas clínicos. Entre animais cuja idade não foi informada, 15,8% (6/38) testaram positivo para RV e quatro deles apresentaram diarreia. O BoRVA foi detectado em todas as idades, enquanto BoRVC foi detectado somente em animais mais jovens (3 meses de idade). A coinfeção de BoRVA e BoRVC foi detectada em um animal de 3 meses de idade (Figura 7, Tabela 4).

Tabela 2. Resultado da análise das amostras fecais de bovinos para a detecção de rotavírus.

Município	Propriedade*	Nº de amostras diarreicas		Nº de amostras não diarreicas	
		Testadas	Positivas	Testadas	Positivas
Aperibé	PF	1	0	3	0
	PG	0	0	9	0
	PH	0	0	10	5
Campos dos Goytacazes	PI	14	2	0	0
Itaocara	PC	3	1	10	3
	PD	7	2	5	0
	PE	2	0	5	2
Itaboraí	PB	5	2	10	1
Sampaio Corrêa/Saquarema	PA	0	0	10	8
Total		32	7 (21,9%)	62	19 (30,1%)

* = código de identificação das propriedades.

Tabela 3. Frequência das infecções por rotavírus nos municípios estudados.

Região*	Município	Nº. amostras testadas	Nº. amostras positivas	Frequência de detecção de BoRV
NO	Aperibé	23	5	21,7%
	Itaocara	32	8	25%
N	Campos de Goytacazes	14	2	14,3%
M	Itaboraí	15	3	20%
L	Sampaio Corrêa/Saquarema	10	8	80%

*: NO = Noroeste; N = Norte; M = Metropolitana; L = Lagos; BoRV = rotavírus de bovino.

Tabela 4. Distribuição de amostras positivas quanto a espécie de rotavírus detectada.

Município	Propriedade*	Nº de amostras diarreicas			Nº de amostras não diarreicas		
		BoRVA	BoRVB	BoRVC	BoRVA	BoRVB	BoRVC
Aperibé	PF	0	0	0	0	0	0
	PG	0	0	0	0	0	0
	PH	0	0	0	5	0	0
Campos dos Goytacazes	PI	2	0	0	0	0	0
	PC	1	0	0	3	0	0
Itaocara	PD	2	0	0	0	0	0
	PE ¹	0	0	0	1	0	2
Itaboraí	PB	1	0	1	0	0	1
Sampaio Corrêa/Saquarema	PA	0	0	0	8	0	0
Total		6	0	1	17	0	3

¹Propriedade PE apresentou uma amostra com coinfeção. BoRVA = rotavírus de bovino da espécie A; RVB = rotavírus de bovino da espécie B; RVC = rotavírus de bovino da espécie C.

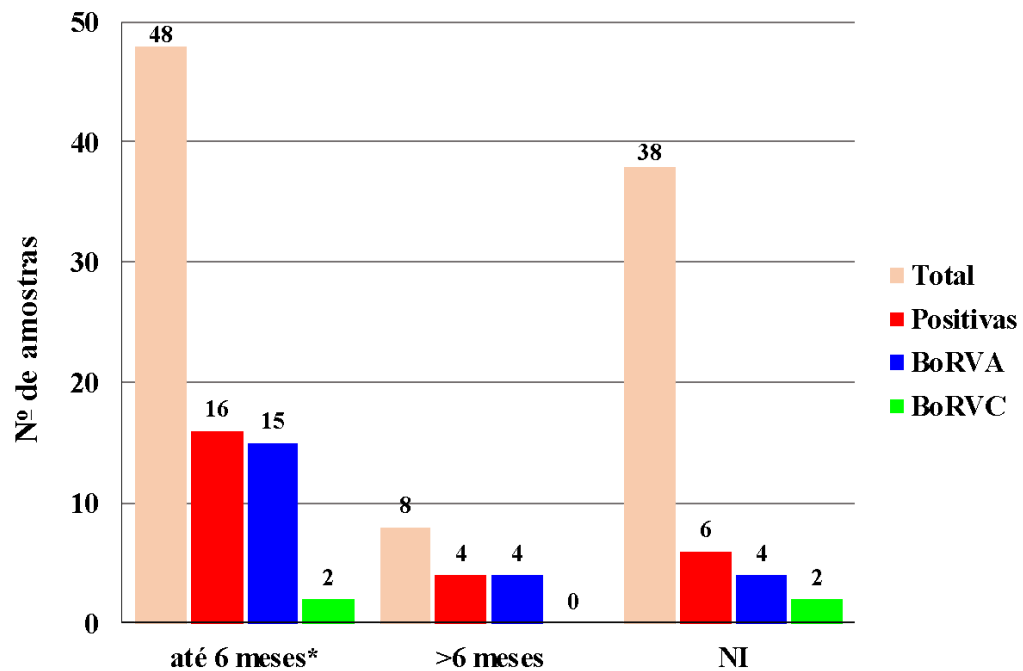


Figura 7. Distribuição etária das amostras positivas para BoRV.

*Uma amostra apresentou coinfeção de BoRVA e BoRVC.

A maioria dos animais que testou positivo para RV estava abaixo de 6 meses de idade (61,5%; 16/26). Para os demais animais positivos para BoRV, 4 (15,4%) estavam acima de 6 meses de idade e, para 6 animais positivos a idade não foi informada. NI = idade não informada; BoRVA = rotavírus de bovino da espécie A; BoRVC = rotavírus de bovino da espécie C.

5.2. Sequenciamento das amostras positivas

Produtos amplificados de 12 amostras positivas para BoRVA foram submetidos ao sequenciamento. As sequências nucleotídicas foram editadas e alinhadas com sequências de referências disponíveis no *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). A análise das sequências confirmou os resultados obtidos nas reações de RT-PCR e identificou o genótipo I2, formando um clado com estirpes bovinas detectadas na Índia e no Japão (Figura 8). Curiosamente, as estirpes agrupadas neste clado apresentam maior identidade nucleotídica com a estirpes de RV símio SA-11-H6 do que com outras estirpes de BoRVA (89,4 – 97,6%).

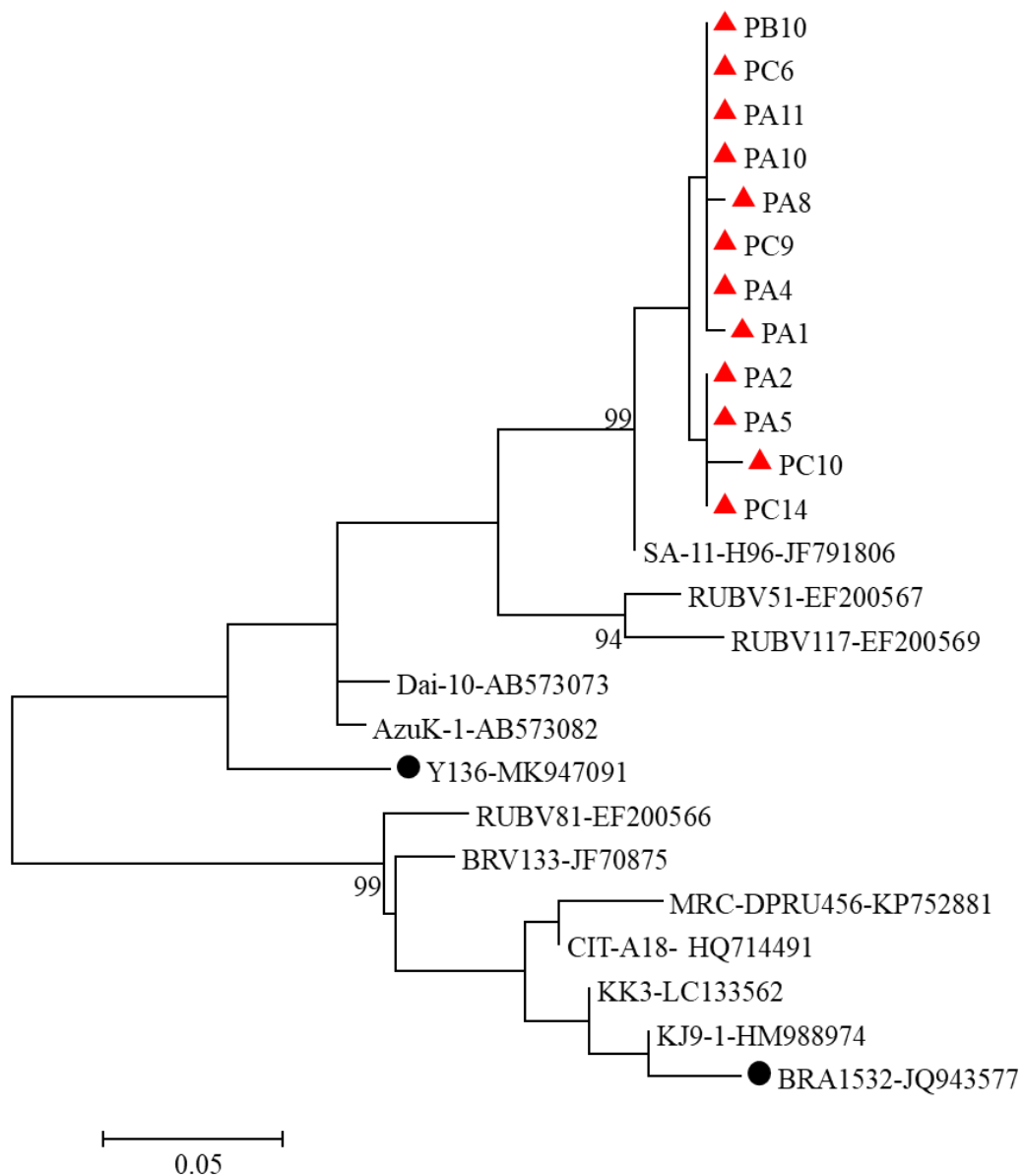


Figura 8. Dendrograma construído a partir das sequências parciais de 209 bp da VP6 de estirpes de BoRVA. As distâncias foram corrigidas utilizando o modelo *Kimura 2-parameter* e o dendrograma foi construído utilizando o método de máxima verossimilhança. O apoio estatístico foi fornecido por *bootstrapping* de 1000 pseudoreplicatas. Valores de *bootstrap* acima de 75% são dados como nós do ramo. Os números de acesso das estirpes de referência no *Genbank* estão mostrados ao lado da identificação das estirpes. As estirpes detectadas neste estudo estão indicadas por triângulos vermelhos. Estirpes previamente identificadas no Brasil estão indicadas por círculos pretos.

6. Discussão

Os RV representam um risco para a bovinocultura uma vez que são responsáveis por quadros de diarreia no rebanho, que geram prejuízos e podem causar a morte dos animais, além disso pode haver a transmissão de estirpes de rotavírus animais para humanos (Cook *et al.*, 2004; Steyer *et al.*, 2008; Martella *et al.*, 2010; Dóro *et al.*, 2015), agravado pela intensa produção pecuária e aumento do contato humano-animal. Desta forma é necessário efetivar políticas de combate a essas infecções e para isso é imprescindível entender a ecologia desses vírus e sua circulação no ambiente, logo é necessário acompanhar essa população, independentemente de serem sintomáticas ou assintomáticas.

Muitos estudos têm contribuído para o entendimento da epidemiologia dos RV entre bovinos, entretanto poucos são os relatos acerca da distribuição do vírus entre o gado brasileiro (Alfieri *et al.*, 2006; Caruzo *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2017; Barros *et al.*, 2018; Fritzen *et al.*, 2019a e b, Curvinel *et al.*, 2020). Nesse contexto, o presente estudo se destaca como o primeiro relato de detecção de RV em fezes de bovinos no estado do Rio de Janeiro. A taxa de infecção por RV observada foi de 27,7% (26/94). Entretanto, não observamos diferença significativa com relação à excreção do vírus entre os animais diarreicos e os não diarreicos. É possível que este dado reflita a ocorrência de elevados índices de infecções assintomáticas, assim como a excreção prolongada do vírus.

Este estudo foi realizado no estado do Rio de Janeiro por vários fatores: (i) não existe nenhum relato sobre os índices de infecção por RV no gado bovino no estado; (ii) o estado ocupa a 13ª posição no ranking da produção leiteira do país, contribuindo para o abastecimento de leite no mercado interno (Zoccal, Alves & Gasques, 2011; Florião, 2013) e; (iii) os produtores foram acessíveis às visitas dos veterinários da PESAGRO/RJ.

A taxa de infecção por BoRV encontrada neste estudo pode ser considerada elevada se comparada com os índices de infecção descritos no país, que variam entre 2,5% e 19,4% (Alfieri *et al.*, 2006; Caruzo *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2017; Barros *et al.*, 2018; Fritzen *et al.*, 2019a e b; Curvinel *et al.*, 2020). A diferença de positividade possivelmente reflete a sensibilidade das metodologias empregadas. Alguns estudos utilizaram a combinação de ensaio imunoenzimático e eletroforese em gel de poliacrilamida (Alfieri *et al.*, 2006; Caruzo *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2017) outros

utilizaram RT-PCR (Barros *et al.*, 2018; Fritzen *et al.*, 2019a e b; Curvinel *et al.*, 2020), assim como no presente estudo, que apresenta maior sensibilidade. Outro fator que pode ter interferido com a taxa de positividade é a procedência das amostras. A maioria dos estudos supracitados foram realizados nos estados de São Paulo, Goiás, Paraná, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, sendo as amostras provenientes de rebanhos leiteiros pertencentes a produtores associados a uma cooperativa de laticínios em que os animais foram manejados com práticas nutricionais e de saúde adequadas (Alfieri *et al.*, 2006; Caruzo *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011; Rocha *et al.*, 2017; Barros *et al.*, 2018; Fritzen *et al.*, 2019a e b; Curvinel *et al.*, 2020). Neste estudo, as amostras foram provenientes de rebanhos pertencentes a pequenos produtores, que carecem de controle sanitário e zootécnico.

Um dado importante foi a detecção da circulação assintomática do vírus em 30,1% (19/62) dos animais pesquisados. A excreção assintomática de RV por bovinos já era conhecida de estudos anteriores (Abe *et al.*, 2009; Steyer *et al.*, 2008; Caruzo *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2011; Fritzen *et al.*, 2019a). A ocorrência de infecções assintomáticas é um fator importante do ponto de vista epidemiológico, visto que animais portadores podem servir como fonte de infecção. Outra observação importante foi o fato de 50% dos animais mais velhos (>6 meses de idade) apresentarem infecção assintomática. Este é um dado relevante, visto que, a literatura reporta que os animais mais velhos são a principal fonte de infecção em animais recém-nascidos (Dhama *et al.*, 2009; Geletu, Usmael e Bari, 2021).

Embora, neste estudo tenha sido demonstrado que a maioria dos animais positivos possuía menos de seis meses de idade, esse foi apenas um dado observacional, já que as fazendas não possuíam dados zootécnicos ou registros confiáveis sobre a sanidade do rebanho. É sabido que, a doença clínica ocorre mais frequentemente em bezerros de até 30 dias, com uma frequência maior em animais entre 1 e 2 semanas de idade (Alfieri *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2011; Coura *et al.*, 2015; Geletu, Usmael e Bari, 2021). Contudo a falta da idade exata de muitos dos animais nesse estudo, dificultou a obtenção de dados estatisticamente significantes entre a relação da sintomatologia clínica e a idade.

Entre as espécies de RV que infectam bovinos, os RVA são detectados com maior frequência, enquanto RVC é observado esporadicamente (Chang *et al.*, 1999; Dhama *et al.*, 2009; Mawatari *et al.*, 2014; Soma *et al.*, 2013; Tsunemitsu, Jiang e Saif, 1996). Neste estudo BoRVA foi detectado em 84,6% (22/26) das amostras positivas; BoRVC foi detectado em

11,5% (3/26) e a coinfeção entre essas espécies foi detectada em uma amostra (3,9%). A coinfeção entre BoRVA e BoRVC em bovinos já foi reportada anteriormente (Chang *et al.*, 1999). Talvez a baixa taxa de detecção de BoRVC em nosso estudo deva-se a idade dos animais pesquisados, os quais eram, em sua maioria jovens e a infecção por esse patógeno é observada principalmente em animais adultos associada à diminuição na produção de leite (Mawatari *et al.*, 2004). Contudo, embora em menor frequência esse dado é relevante pois trata-se do primeiro relato de detecção de RVC em bovinos no Brasil.

A ausência de RVB pode ser explicada pelo fato de essa espécie ser normalmente encontrada em países como Alemanha, Estados Unidos, Japão, Índia e Reino Unido (Barman *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 1997; Chasey & Davies, 1984; Chinsangaram *et al.*, 1995; Ghosh *et al.*, 2007; Hayashi *et al.*, 2001, 2016; Otto *et al.*, 2015; Tsunemitsu *et al.*, 1999) não tendo sido descrita em bovinos no Brasil, até o momento. Mais uma vez, a idade dos animais estudados pode ter sido um fator importante uma vez que, as infecções por esse agente são geralmente descritas em animais adultos (Chang *et al.*, 1997; Tsunemitsu *et al.*, 1999) e a maioria das amostras analisadas em nosso estudo foi proveniente de animais jovens.

Com o sequenciamento foi possível confirmar a identificação do BoRVA e demonstrar o espalhamento desses vírus dentro do rebanho fluminense uma vez que estirpes detectadas em três regiões distintas – região dos Lagos, Metropolitana e Noroeste – do estado, apresentaram identidade nucleotídica acima de 98% entre si. Esse dado sugere que a transmissão do vírus entre os diferentes rebanhos seja por contato direto entre animais em prováveis centros comerciais, existe também a possibilidade da contaminação pela água, uma vez que os municípios de Aperibé e Itaocara fazem parte de uma mesma bacia hidrográfica .

A caracterização molecular do gene que codifica a VP6 demonstrou a circulação dos genótipos I1, I2, e I5 entre estirpes de BoRVA (Matthijnssens *et al.*, 2008). A análise filogenética das estirpes detectadas nesse estudo, permitiu a identificação do genótipo I2, o qual é o mais comum entre estirpes de BoRVA. Outros estudos também descreveram a circulação do genótipo I2 bovinos no Brasil (Medeiros *et al.*, 2015; Fritzen *et al.*, 2020). Estamos cientes de que o tamanho dos fragmentos obtidos neste estudo é menor que o recomendado pelo grupo de classificação de rotavírus, porém os dados obtidos na literatura validam os resultados deste estudo.

Estudos anteriores relataram a similaridade entre estirpes de BoRVA e RVA símio (Ghosh *et al.*, 2007; Abe *et al.*, 2011), inclusive no Brasil (Fritzen *et al.*, 2020). No dendrograma as estirpes analisadas formaram um clado com outras estirpes de BoRVA I2 do Brasil (Y136) da Índia (RUBV51 e RUBV117) e do Japão (Azuk-1 e Dai-10) e com o RVA símio SA-11-H96. Recentemente, a análise de diversas estirpes de RVA de diferentes espécies de hospedeiros, revelou a existências de três cladogramas distintos dentro do genótipo I2 (Sawant, Digraskar e Gopalkrishna, 2020). As estirpes bovinas agrupam nos três cladogramas, contudo, as estirpes pertencentes ao clado 3 incluem vírus de bovinos, humanos, cervídeos e a estirpe símia SA-11-H96. Também já foi descrita uma estirpe de bovinos contendo a VP7 de origem símia (Malik *et al.*, 2016). Esses achados sugerem a possibilidade de estas estirpes terem surgido a partir de eventos de reagrupamentos gênicos entre essas espécies hospedeiras.

Eventuais falhas na proteção vacinal têm sido atribuídas a diversos fatores, incluindo as diferenças antigênicas entre estirpes vacinais e circulantes de BoRVA (Geletu, Usmael e Bari, 2021). Diversos estudos realizados no Brasil confirmam esse fato e reforçam a necessidade de monitoramento contínuo das estirpes circulantes e análise de sua composição genética e antigênica em comparação com as estirpes vacinais (Barreiros *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2017; Fritzen *et al.*, 2019b).

Uma característica marcante do genoma dos RV é sua capacidade de fazer reagrupamento genético (Desselberger, Gray e Estes, 2005; Dhama *et al.* 2005; Gentsch *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2010; Matthijssens e Desselberger, 2012). Este tem sido considerado o principal mecanismo evolutivo dos RV, facilitando o cruzamento da barreira interespecies e permitindo a transmissão de estirpes heterólogas e sua adaptação a novas espécies hospedeiras (Cook *et al.*, 2004; Mukherjee *et al.*, 2009; Martella *et al.*, 2010; Dóro *et al.*, 2015; Komoto *et al.*, 2016; Marton *et al.*, 2017; Castells *et al.*, 2020). Diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de reagrupamento gênico entre estirpes de BoRV e estirpes originárias de outros hospedeiros, inclusive seres humanos resultando em infecções sintomáticas (Matthijssens *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2014; Dóro *et al.*, 2015; Komoto *et al.*, 2016; Tacharoenmuang *et al.*, 2016; Bwogi *et al.*, 2017; Marton *et al.*, 2017; Moutelíková *et al.*, 2019; Castells *et al.*, 2020; Mishra *et al.*, 2020). De fato, a infecção de seres humanos por estirpes contendo segmentos genômicos de origem bovina também foram descritas em crianças brasileiras apresentando diarreia (Santos *et al.*, 1998; Volotão *et al.*, 2006; Luchs e Timenetsky, 2014a e b). Esse fato,

torna ainda mais contundente a necessidade de criação e manutenção de um programa de vigilância das estirpes circulantes entre animais, à semelhança do que existe para seres humanos. O cruzamento das informações obtidas entre esses dois sistemas de vigilância, provavelmente iria auxiliar na compreensão do complexo processo evolutivo desses vírus, além de nortear os programas de prevenção e controle da rotavirose humana e animal.

Os resultados obtidos neste estudo, demonstraram a circulação de BoRV em todos os municípios pesquisados, abrangendo 4 das 7 regiões do estado fluminense; contudo, não foram obtidas amostras das regiões Serrana, Centro Sul e Médio Paraíso. Considerando a elevada frequência da infecção por BoRV encontrada, é possível especular que este patógeno possa estar amplamente disseminado no rebanho bovino do estado. Foi ainda demonstrada a presença de BoRVC no rebanho bovino do estado, sendo esta a primeira descrição desse agente em bovinos no país. Desta forma, os dados aqui apresentados são relevantes e devem contribuir para aprimorar o conhecimento sobre a importância e disseminação do BoRV no território nacional e auxiliar no planejamento e implantação de medidas de controle e prevenção da rotavirose bovina no Brasil.

7. Conclusões

- ✓ A alta taxa de infecção por BoRV (27,7%; 26/94) observada neste estudo mostra a disseminação deste agente viral nos rebanhos estudados.
- ✓ O BoRV é endêmico no rebanho bovino do estado do Rio de Janeiro, estando presente em todos os municípios onde foram coletadas as amostras.
- ✓ Dentre as amostras positivas (n=26), o BoRVA foi detectado em 22 (84,6%), BoRVC em três (11,5%), 1 amostra (3,9%) apresentou coinfeção por BoRVA e BoRVC e BoRVB não foi detectado.
- ✓ A análise das sequências de uma porção do gene que codifica a VP6 de 12 estirpes de BoRVA mostrou que todas as estirpes possuem especificidade genotípica I2, que é o genótipo mais comum entre bovinos.
- ✓ As estirpes bovinas fluminenses agruparam em um clado do genótipo I2 que contém estirpes de diferentes espécies hospedeiras, incluindo seres humanos, bovinos, cervídeos e símios.
- ✓ A circulação de uma mesma estirpe viral em municípios distantes sugere que a transmissão do vírus entre os diferentes rebanhos seja por contato direto entre animais em prováveis centros comerciais.

8. Referências bibliográficas

- Abe, M., Ito, N., Morikawa, S., Takasu, M., Murase, T., Kawashima, T., Kawai, J. K. e Sugiyama, M. (2009). Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan: Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. *Virus Res.* 144, 250-257.
- Abe, M., Ito, N., Masatani, T., Nakagawa, K., Yamaoka, S., Kanamaru, Y., Suzuki, H., Shibano, K., Arashi, Y. e Sugiyama, M. (2011). Whole genome characterization of new bovine rotavirus G21P[29] and G24P[33] strains provides evidence for interspecies transmission. *J. Gen. Virol.* 92, 952-960.
- ABIEC (2021). Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Beef Report. Perfil da pecuária no Brasil. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2021/>. Acesso em 16/09/2021.
- Adams, W.R. e Kraft, L.M. (1963). Epizootic diarrhea of infant mice: identification of the etiologic agent. *Science* 141, 359-360.
- Alfieri, A.A., Parazzi, M.E., Takiuchi, E., Médici, K.C. e Alfieri, A.F. (2006). Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 521-526.
- Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Matos, A.C.D., Lorenzetti, E. e Lobato, Z.I.P. (2012). In: *Reoviridae. Virologia Veterinária*, 2ª Ed. Flores, E. F. (Rio Grande do Sul: Editora da UFSM), pp. 899-940.
- Anderson, E. J. e Weber, S. G. (2004). Rotavirus infection in adults. *Lancet Infect. Dis.* 4, 91-99.
- Askaa, J. e Block, B. (1984). Infection in piglets with a porcine rotavirus-like virus. Experimental inoculation and ultrastructural examination. *Arch. Virol.* 80, 291-303.
- Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., Varga-Kugler, R., Oldal, M., Kurucz, K. e Jakab, F. (2017). Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 48, 19-26.
- Barreiros, M.A., Alfieri, A.F., Médici, K.C., Leite, J.P. e Alfieri, A.A. (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, 104-109.
- Barman, P., Ghosh, S., Das, S., Varghese, V., Chaudhuri, S., Sarkar, S., Krishnan, T., Bhattacharya, S. K., Chakrabarti, A., Kobayashi, N. e Naik, T.N. (2004). Sequencing and sequence analysis of VP7 and NSP5 genes reveal emergence of a new genotype of bovine group B rotaviruses in India. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2816-2818.
- Barros, B.C.V., Chagas, E.N., Bezerra, L.W., Ribeiro, L.G., Duarte Júnior, J.W.B., Pereira, D., da Penha Junior, E.T., Silva, J.R., Bezerra, D.A.M., Bandeira, R.S., Pinheiro, H.H.C., Guerra, S.F.D.S., Guimarães, R.J. P. S. E. e Mascarenhas, J.D.P. (2018). Rotavirus A in wild and domestic animals from areas with environmental degradation in the Brazilian Amazon. *PLoS One* 13, e0209005.
- Bishop, R.F., Davidson, G.P., Holmes, I.H., e Ruck, B.J. (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet* 2, 1281-1283.
- Brown, D.W., Beards, G.M., Chen, G.M. e Flewett, T.H. (1987). Prevalence of antibody to group B (atypical) rotavirus in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* 25, 316-319.
- Bwogi, J., Jere, K. C., Karamagi, C., Byarugaba, D. K., Namuwulya, P., Baliraine, F. N., Desselberger, U. e Iturriza-Gomara, M. (2017). Whole genome analysis of selected human and animal rotaviruses identified in Uganda from 2012 to 2014 reveals complex genome reassortment events between human, bovine, caprine and porcine strains. *PLoS One.* 12, e0178855.
- Caruzo, T.A., Brito, W.M., Munford, V. e Rác, M.L. (2010). Molecular characterization of G and P-types bovine rotavirus strains from Goiás, Brazil: high frequency of mixed P-type infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 1040-1043.
- Castello, A.A., Argüelles, M.H., Villegas, G.A., Olthoff, A. e Glikmann, G. (2002). Incidence and prevalence of human group C rotavirus infections in Argentina. *J. Med. Virol.* 67, 106-112.
- Castells, M., Caffarena, R.D., Casaux, M.L., Schild, C., Miño, S., Castells, F., Castells, D., Victoria, M., Riet-Correa, F., Giannitti, F., Parreño, V. e Colina, R. (2020). Phylogenetic analyses of rotavirus A from cattle in Uruguay reveal the circulation of common and uncommon genotypes and suggest interspecies transmission. *Pathogens.* 9, 570.

- Chang, K. O., Parwani, A. V., Smith, D. e Saif, L. J. (1997). Detection of group B rotaviruses in fecal samples from diarrheic calves and adult cows and characterization of their VP7 Genes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2107-2110.
- Chang, K. O., Nielsen, P.R., Ward, L.A. e Saif, L.J. (1999). Dual infection of gnotobiotic calves with bovine strains of group A and porcine-like group C rotaviruses influences pathogenesis of the group C rotavirus. *J. Virol.* 73, 9284-9293.
- Chang, K.O. e Kim, Y. (2012). Reoviruses (Rotaviruses and Reoviruses). In: Diseases of swine, 10^o edition. Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G.W. (Iowa: Wiley-Blackwell), pp. 621-634.
- Chasey, D. e Davies, P. (1984). Atypical rotaviruses in pigs and cattle. *Vet. Rec.* 114, 16-17.
- Chauhan, R.S. e Singh, N.P. (1996). Epidemiology of rotavirus infection in calves in India. *Int. J. Anim. Sciences* 11, 221-223.
- Chinsangaram, J., Schore, C.E., Guterbock, W., Weaver, L.D. e Osburn, B.I. (1995). Prevalence of group A and group B rotaviruses in the feces of neonatal dairy calves from California. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 93-103.
- Cho, Y.I e Yoon, K. J. J. (2014). An overview of calf diarrhea—Infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 15, 1-17.
- Cook, N., Bridger, J., Kendall, K., Gomara, M. I., El-Attar, L. e Gray, J. (2004). The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infec.* 48, 289-302.
- Coura, F.M., Freitas, M.D., Ribeiro, J., Leme, R.A., Souza, C., Alfieri, A.A., Facury Filho, E.J., Carvalho, A.U., Silva, M.X., Lage, A.P. e Heinemann, M.B. (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, 3-11.
- Crouch, C.F., Oliver, S. e Francis, M.J. (2001). Serological, colostral and milk responses of cows vaccinated with a single dose of a combined vaccine against rotavirus, coronavirus and Escherichia coli F5 (K99). *Vet. Rec.* 149, 105-108.
- Curvinel, L.B., Ayres, H., Zapa, D., Nicaretta, J.E., Couto, L., Heller, L.M., Bastos, T., Cruz, B.C., Soares, V.E., Teixeira, W.F., de Oliveira, J.S., Fritzen, J.T., Alfieri, A.A., Freire, R.L. e Lopes, W. (2020). Prevalence and risk factors for agents causing diarrhea (Coronavirus, Rotavirus, Cryptosporidium spp., Eimeria spp., and nematodes helminthes) according to age in dairy calves from Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 777-791.
- Desselberger, U., Gray, J. e Estes, M.K. (2005). Rotaviruses. In: B.W.J. Mahy and V.T. Meulen (eds), Topley and Wilson's Microbiology and Microbial infections, ASM press, USA, 946-958.
- Dhama, K., Chauhan, R.S., Kataria, J.M., Mahendran, M. e Tomar, S. (2005). Avian Influenza: The current perspectives. *J. Immunol. Immunopathol.*, 7, 1-33.
- Dhama, K., Chauhan, R. S., Mahendran, M. e Malik, S. V. S. (2009). Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals. *Vet. Res. Commun.*, 33, 1-23.
- Dimitrov, D.H., Estes, M.K., Rangelova, S.M., Shindarov, L.M., Melnick, J.L. e Graham, D.Y. (1983). Detection of antigenically distinct rotaviruses from infants. *Infect. Immun.* 41, 523-526.
- Dóro, R., Farkas, S.L., Martella, V., Bányai, K. (2015). Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 13, 1337-1350.
- Durel, L., Rose, C., Bainbridge, T., Roubert, J., Dressel, K.U., Bennemann, J., Rückner, A., Vahlenkamp, T. e Maillard, R. (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.
- EMBRAPA (2015). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Circular Técnica. Manual de boas práticas de vacinação e imunização de bovinos. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/128128/1/CiT-47-15-online.pdf>. Acesso em 25/09/2021.
- EMBRAPA (2020). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Anuário do leite 2020. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215763/1/AnuarioLEITE2020.pdf>. Acesso em 25/09/2021.

- Estes, M.K. e Greenberg, H.B. (2013). Rotaviruses. In: Fields Virology, 6th edition, Vol 1. Knipe, D.M., Howley, P.M., Cohen, J.I, Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Racaniello, V.R. e Rizman, B., eds. (Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott, Williams e Wilkins), 1347-1401.
- Estes, M.K. e Kapikian A. (2007). Rotaviruses. In: Fields virology, 5th edition. Knipe, D. M., Howley, P. M., eds. (Philadelphia: Lippincott, Williams eWilkins), p. 1924.
- FAO (2021). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Meat Market Review. Disponível em: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/meat/meat-and-meat-products-update/en/>. Acesso em 17/09/2021.
- Flores, P.S., Costa, F.B., Amorim, A.R., Mendes, G.S., Rojas, M. e Santos, N. (2021). Rotavirus A, C, and H in Brazilian pigs: potential for zoonotic transmission of RVA. *J. Vet. Diagn. Invest.* 33, 129-135.
- Florião, M. L. (2013). Bovinocultura leiteira com ênfase em sanidade preventiva. Programa Rio Rural, Niterói. Secretaria de Estado de Agricultura e Pecuária, Superintendência de Desenvolvimento Sustentável Manual Técnico; 38, ISSN 1983-5671.
- Foster, D. M e Smith, G. W. (2009). Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 25, 13-36.
- Freitas, P.P.S., Uyemura, S.A., Silva, D.G., Samara, S.I. e Buzinaro, M.G. (2011). Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 63, 820-827.
- Fritzen, J.T.T., Oliveira, M.V., Lorenzetti, E., Miyabe, F.M., Viziack, M.P., Rodrigues, C.A., Ayres, H., Alfieri, A.F. e Alfieri, A.A. (2019a). Longitudinal surveillance of rotavirus A genotypes circulating in a high milk yield dairy cattle herd after the introduction of a rotavirus vaccine. *Vet. Microbiol.* 230, 260-264.
- Fritzen, J.T.T., Lorenzetti, E., Oliveira, M.V., Bon, V.R., Ayres, H., Alfieri, A.F. e Alfieri, A.A. (2019b) Cross-sectional study of the G and P genotypes of rotavirus A field strains circulating in regularly vaccinated dairy cattle herds. *Trop. Anim. Health Prod.* 51, 887-892.
- Fritzen, J.T.T., Oliveira, M.V., Lorenzetti, E., Alfieri, A.F. e Alfieri, A.A. (2020). Genotype constellation of a rotavirus A field strain with an uncommon G8P[11] genotype combination in a rotavirus-vaccinated dairy cattle herd. *Arch. Virol.* 165, 1855-1861.
- Geletu, U. S., Usmael, M. A. e Bari, F. D. (2021). Rotavirus in Calves and Its Zoonotic Importance. *Vet. Med. Int.* 2021, 2021:6639701.
- Gentsch, J.R., Laird, A.R., Bielfelt, B., Griffin, D.D., Banyai, K., Ramachandran, M., Jain, V., Cunliffe, N.A., Nakagomi, O., Kirkwood, C.D., Fischer, T.K., Parashar, U.D., Bresee, J.S., Jiang, B. e Glass, R.I. (2005). Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 192(Suppl 1), S146-S159.
- Ghosh, S., Varghese, V., Sinha, M., Kobayashi, N. e Naik, T. N. (2007). 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. *Epidemiol. Infect.* 135, 1324–1330.
- Godden, S.M., Lombard, J.E. e Woolums, A.R. (2019). Colostrum Management for Dairy Calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 35, 535–556.
- Gomez, D.E. e Weese, J.S. (2017). Viral enteritis in calves. *Can. Vet. J.*, 58, 1267–1274.
- Gouvea, V., Allen, J.R., Glass, R.I., Fang, Z.Y., Bremont, M., Cohen, J., McCrae, M.A., Saif, L.J., Sinarachatanant, P. e Caul, E.O. (1991). Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29, 519-523.
- Hagbom, M., Istrate, C., Engblom, D., Karlsson, T., Rodriguez-Diaz, J., Buesa, J., Taylor, J. A., Loitto, V.M., Magnusson, K.E., Ahlman, H., Lundgren, O. e Svensson, L. (2011). Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting. *PLoS Pathog.* 7, e1002115.
- Hayashi, M., Murakami, T., Kuroda, Y., Takai, H., Ide, H., Awang, A., Suzuki, T., Miyazaki, A., Nagai, M. e Tsunemitsu, H. (2016). Reinfection of adult cattle with rotavirus B during repeated outbreaks of epidemic diarrhea. *Can. J. Vet. Res.* 80, 189-196.

- Hayashi, M., Nagai, M., Hayakawa, Y., Takeuchi, K. e Tsunemitsu, H. (2001). Outbreak of diarrhoea and milk drop in cows infected with bovine group B rotavirus. *Vet. Rec.* 15, 331-332.
- Iturriza-Gómara, M., Wong, C., Blome, S., Desselberger, U. e Gray, J. (2002). Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. *J. Virol.* 7, 6596-6601.
- Jayaram, H., Estes, M.K. e Prasad, B.V. (2004). Emerging themes in rotavirus cell entry, genome organization, transcription and replication. *Virus Res.* 101, 67-81.
- Jeong, S., Than, V.T., Lim, I. e Kim, W. (2014). Whole-genome analysis of a rare human Korean G3P rotavirus strain suggests a complex evolutionary origin potentially involving reassortment events between feline and bovine rotaviruses. *PLoS One* 9, e97127.
- Johne, R., Tausch, S.H., Grütze, J., Falkenhagen, A., Patzina-Mehling, C., Beer, M., Höper, D., Ulrich, R.G. (2019). Distantly Related Rotaviruses in Common Shrews, Germany, 2004-2014. *Emerg Infect Dis.* 12:2310-2314.
- Komoto, S., Pongsuwannab, Y., Tacharoenmuangb, R., Guntapongb, R., Idea, T., Higo-Moriguchia, K., Tsujic, T., Yoshikawad, T. e Taniguchia, K. (2016). Whole genomic analysis of bovine group A rotavirus strains A5-10 and A5-13 provides evidence for close evolutionary relationship with human rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 195, 37-57.
- Kumar, S., Stecher, G. e Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874.
- Larson, R.L., Tyler, J.W., Schultz, L.G., Tessman, R.K. e Hostetler, D.E. (2004). Management strategies to decrease calf death losses in beef herds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224, 42-48.
- Luchs, A., Morillo, S.G., de Oliveira, C.M. e Timenetsky, M.C. (2011). Monitoring of group C rotavirus in children with acute gastroenteritis in Brazil: an emergent epidemiological issue after rotavirus vaccine? *J. Med. Virol.* 83, 1631-1636.
- Luchs, A. e Timenetsky, M.C. (2014a). Unexpected detection of bovine G10 rotavirus in a Brazilian child with diarrhea. *J Clin Virol.* 59, 74-76.
- Luchs, A. e Timenetsky, M.D.C.S.T. (2014b). G8P[6] rotaviruses isolated from Amerindian children in Mato Grosso do Sul, Brazil, during 2009: close relationship of the G and P genes with those of bovine and bat strains. *J Gen Virol.* 95, 627-641.
- Lundgren, O. e Svensson, L. (2001). Pathogenesis of rotavirus diarrhea. *Microbes Infect.* 3, 1145-1156.
- Malherbe, H.H. e Strickland-Chomley, M. (1967). Simian virus SA11 and the related 'O' agent. *Arch. Gesamte. Virusforsch* 22, 235-245.
- Malik, Y. S., Kumar, N., Sharma, K., Saurabh, S., Dhama, K., Prasad, M., Ghosh, S., Bányai, K., Kobayashi, N. e Singh, R. K. (2016). Multispecies reassortant bovine rotavirus strain carries a novel simian G3-like VP7 genotype. *Infect. Genet. Evol.* 41, 63-72.
- Manchetes do Rio de Janeiro. (2013). Mapa municípios do estado do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://manchetesdoriodejaneiro.blogspot.com/2013/11/mapa-municipios-do-estado-do-rio-de.html>. Acesso em 05/10/2019.
- MAPA (2013). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 50, de 24 de Setembro de 2013. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/arquivos-sisa/Listadodoen casanimaisdenotificaoobrigatoria.pdf/view>. Acesso em 25/09/2021.
- Martella, V., Bányai, K., Matthijnsens, J., Buonavoglia, C. e Ciarlet, M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Microbiol.* 140, 246-255.
- Marton, S., Dóró, R., Fehér, E., Forró, B., Ihász, K., Varga-Kugler, R., Farkas, S.L. e Bányai, K. (2017). Whole genome sequencing of a rare rotavirus from archived stool sample demonstrates independent zoonotic origin of human G8P[14] strains in Hungary. *Virus Res.* 227, 96-103.
- Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., Palombo, E. A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J. T., Rahman, M. e Van Ranst, M. (2008). 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. *J. Virol.* 82, 3204-3219.
- Matthijnssens, J., Potgieter, C.A., Ciarlet, M., Parreño, V., Martella, V., Bányai, K., Garaicoechea, L., Palombo, E.A., Novo, L., Zeller, M., Arista, S., Gerna, G., Rahman, M. e Ranst, M. (2009). Are human P[14] rotavirus strains the result of interspecies transmissions from sheep or other ungulates that belong to the mammalian order Artiodactyla? *J. Virol.* 83:2917–2929.
- Matthijnssens, J., Martella, V. e Van Ranst, M. (2010). Genomic evolution, host-species barrier, reassortment and classification of rotaviruses. *Future Virol.* 5, 385–390.
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J. R., Buesa, J., Esona, M. D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johnne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P. P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F. M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U., Van Ranst, M. (2011). Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397-1413.
- Matthijnssens, J. e Desselberger, U. (2012). Genome diversity and evolution of rotaviruses. In: *Genome Plasticity and Infectious Diseases*. Hacker, J., Dobrindt, U., Kurth, R., eds. (Washington: ASM Press), 219–241.
- Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., Van Ranst, M. e Johnne, R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 157:1177–1182.
- Mawatari, T., Taneichi, A., Kawagoe, T., Hosokawa, M., Togashi, K. e Tsunemitsu, H. (2004). Detection of a bovine group C rotavirus from adult cows with diarrhea and reduced milk production. *J. Vet. Med. Sci.* 66, 887–890.
- Mawatari, T., Hirano, K., Tsunemitsu, H. e Suzuki, T. (2014). Whole-genome analysis of bovine rotavirus species C isolates obtained in Yamagata, Japan, 2003-2010. *J. Gen. Virol.* 95, 1117-1125.
- McNulty, M.S., Allan, G.M., Todd, D., McFerran, J.B. e McCracken, R.M. (1981). Isolation from chickens of a rotavirus lacking the rotavirus group antigen. *J. Gen. Virol.* 55, 405-413.
- McNulty, M.S. (1983). The etiology, pathology and epidemiology of viral gastroenteritis rotavirus infections in calves. *Ann. Rech. Vét.* 14, 427-432.
- Mebus, C.A., Underdahl, N.R., Rhodes, M.B. e Twiehaus, M.J. (1969). Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Univ. Nebraska Res. Bull.* 233, 1–16.
- Medeiros, T.N.S., Lorenzetti, E., Alfieri, A.F. e Alfieri, A.A. (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, 447-451.
- Medeiros, T.N.S., Lorenzetti, E., Alfieri, A.F. e Alfieri, A.A. (2019). G and P genotype profiles of rotavirus A field strains circulating in beef and dairy cattle herds in Brazil, 2006-2015. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 64, 90-98.
- Médici, K.C., Barry, A.F., Alfieri, A.F. e Alfieri, A.A. (2010). Genetic analysis of the porcine group B rotavirus NSP2 gene from wild-type Brazilian strains. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 13-16.
- Mihalov-Kovács, E., Gellért, Á., Marton, S., Farkas, S.L., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Martella, V., Bányai, K. (2015). Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 21:660-663.
- Mishra, N., Reslan, L., El-Husseini, M., Raoof, H., Finianos, M., Guo, C., Thakkar, R., Inati, A., Dbaibo, G., Lipkin, W.I. e Zaraket, H. (2020). Full genome characterization of human G3P[6] and G3P[9] rotavirus strains in Lebanon. *Infect. Genet. Evol.* 78, 104133.
- Miyabe, F.M., Dall Agnol, A.M., Leme, R.A., Oliveira, T.E.S., Headley, S.A., Fernandes, T., de Oliveira, A.G., Alfieri, A.F. e Alfieri, A.A. (2020). Porcine rotavirus B as primary causative agent of diarrhea outbreaks in newborn piglets. *Sci. Rep.* 10, 22002.
- Moutelíková, R., Sauer, P., Dvořáková Heroldová, M., Holá, V. e Proďlalová, J. (2019). Emergence of Rare bovine-human reassortant DS-1-like rotavirus A strains with G8P[8] genotype in human patients in the Czech Republic. *Viruses* 11, 1015.
- Mukherjee, A., Dutta, D., Ghosh, S., Bagchi, P., Chattopadhyay, S., Nagashima, S., Kobayashi, N., Dutta, P., Krishnan, T., Naik, T. N. e Chawla-Sarkar, M. (2009). Full genomic analysis of a human group A rotavirus

- G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 154, 733-746.
- Oliveira Filho, J.P., Silva, D.P.G., Pacheco, M., Mascarini, L.M., Ribeiro, M.G., Alfieri, A.A., Alfieri, A.F., Stipp, D.T., Barros, B.J.P. e Borges, A.S. (2007). Diarrhea in Nelore calves: Clinical and etiologic study. *Braz. J. Vet. Res.* 27, 419-424.
- Oliveira, J. R., Marques, E. A., Tonaco, I. A. e Duarte, N. F. Biossegurança e vazío sanitário das instalações zootécnicas. *PUBVET, Londrina, V. 4, N. 7, Ed. 112, Art. 754, 2010.*
- Otto, P. H., Rosenhain, S., Elschner, M. C., Hotzel, H., Machnowska, P., Trojnar, E. e Johne, R. (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, 168-176.
- Otto, P., Schulze, P. e Herbst, W. (1999). Demonstration of group C rotaviruses in fecal samples of diarrheic dogs in Germany. *Arch. Virol.* 144, 2467-2473.
- Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijssens, J., Ciarlet, M., Martella, V. e Bányai, K. (2013). Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165, 190-199.
- Peñaranda, M.E., Cubitt, W.D., Sinarachatanant, P., Taylor, D.N., Likanonsakul, S., Saif, L. e Glass, R.I. (1989). Group C rotavirus infections in patients with diarrhea in Thailand, Nepal, and England. *J. Infect. Dis.* 160, 392-397.
- Ramos, A.P., Stefanelli, C.C., Linhares, R.E., de Brito, B.G., Santos, N., Gouvea, V., Lima, R.C. e Nozawa, C. (2000). The stability of porcine rotavirus in feces. *Vet. Microbiol.* 71, 1-8.
- Rocha, T.G., Silva, F.D., Gregori, F., Alfieri, A.A., Buzinaro, M.D. e Fagliari, J.J. (2017). Longitudinal study of bovine rotavirus group A in newborn calves from vaccinated and unvaccinated dairy herds. *Trop. Anim. Health Prod.* 49, 783-790.
- Rodger, S.M., Bishop, R.F. e Holmes, I.H. (1982). Detection of a rotavirus-like agent associated with diarrhea in an infant. *J. Clin. Microbiol.* 16, 724-726.
- Rojas, M., Gonçalves, J.L., Dias, H.G., Manchego, A., Pezo, D. e Santos, N. (2016). Whole-genome characterization of a Peruvian alpaca rotavirus isolate expressing a novel VP4 genotype. *Vet. Microbiol.* 196, 27-35.
- Ruiz, M.C., Leon, T., Diaz, Y. e Michelangeli, F. (2009). Molecular biology of rotavirus entry and replication. *ScientificWorldJournal* 9, 1476-1497.
- Sadiq, A., Bostan, N., Yinda, K.C., Naseem, S. e Sattar, S. (2018). Rotavirus: Genetics, pathogenesis and vaccine advances. *Rev. Med. Virol.* 28, e2003.
- Saif, L.J., Bohl, E.H., Theil, K.W., Cross, R.F. e House, J.A. (1980). Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs. *J. Clin. Microbiol.* 12, 105-111.
- Santos, N., Lima, R.C., Pereira, C.F. e Gouvea, V. (1998). Detection of rotavirus types G8 and G10 among Brazilian children with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 36, 2727-2729.
- Sawant, P.M., Digraskar, S.S. e Gopalkrishna, V. (2020). Molecular characterization of unusual G10P[33], G6P[14] genomic constellations of group A rotavirus and evidence of zoonanthroposis in bovines. *Infect. Genet. Evol.* 84, 104385.
- Schnagl, R.D., Boniface, K., Cardwell, P., McCarthy, D., Ondracek, C., Coulson, B., Erlich, J. e Morey, F. (2004). Incidence of group C human rotavirus in central Australia and sequence variation of the VP7 and VP4 genes. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2127-33.
- Sebata, T. e Steele, A.D. (1999). Human group C rotavirus identified in South Africa. *S. Afr. Med.* 89, 1073-1074.
- Soma, J., Tsunemitsu, H., Miyamoto, T., Suzuki, G., Sasaki, T. e Suzuki, T. (2013). Whole-genome analysis of two bovine rotavirus C strains: Shintoku and Toyama. *J. Gen. Virol.* 94, 128-135.
- Steyer, A., Poljšak-Prijatelj, M., Barlič-Maganja, D. e Marin, J. (2008). Human, porcine and bovine rotaviruses in Slovenia: evidence of interspecies transmission and genome reassortment. *J. Gen. Virology.* 89, 1690-1698.

- Tacharoenmuang, R., Komoto, S., Guntapong, R.I.T., Sinchai, P., Upachai, S., Yoshikawa, T., Tharmaphornpilas, P., Sangkitporn, S. e Taniguchi K. (2016). Full genome characterization of novel DS-1-Like G8P[8] rotavirus strains that have emerged in Thailand: reassortment of bovine and human rotavirus gene segments in emerging DS-1-like intergenogroup reassortant strains. *PLoS One* 11, e0165826.
- Tsunemitsu, H., Saif, L.J., Jiang, B.M., Shimizu, M., Hiro, M., Yamaguchi, H., Ishiyama, T. e Hirai, T. (1991). Isolation, characterization, and serial propagation of a bovine group C rotavirus in a monkey kidney cell line (MA104). *J. Clin. Microbiol.* 29, 2609–2613.
- Tsunemitsu, H., Jiang, B. e Saif, L. J. (1996). Sequence comparison of the VP7 gene encoding the outer capsid glycoprotein among animal and human group C rotaviruses. *Arch. Virol.* 141, 705–713.
- Tsunemitsu, H., Morita, D., Takaku, H., Nishimori, T., Imai, K. e Saif, L. J. (1999). First detection of bovine group B rotavirus in Japan and sequence of its VP7 gene. *Arch. Virol.* 144, 805-815.
- Tsunemitsu, H., Kamiyama, M., Kawashima, K., Katsuda, K., Kohmoto, M., Saif, L.J., Shouji, T., Onodera, T. (2005). Molecular characterization of the major capsid protein VP6 of bovine group B rotavirus and its use in seroepidemiology. *J. Gen. Virol.* 86, 2569–2575.
- Usonis, V., Ivaskeviciene, I., Desselberger, U. e Rodrigo, C. (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, 4596-605.
- Volotão, E.M., Soares, C.C., Maranhão, A.G., Rocha, L.N., Hoshino, Y. e Santos, N. (2006). Rotavirus surveillance in the city of Rio de Janeiro-Brazil during 2000-2004: detection of unusual strains with G8P[4] or G10P[9] specificities. *J. Med. Virol.* 78, 263-272.
- Vonderfecht, S.L., Eiden, J.J., Torres, A., Miskuff, R.L., Mebus, C.A. e Yolken, R.H. (1986). Identification of a bovine enteric syncytial virus as a non-group A rotavirus. *Am. J. Vet. Res.* 47, 1913-1918.
- Zoccal, R., Alves, E. R. e Gasques, J. G. (2011). Estudo preliminar contribuição para o plano pecuário 2012 - Diagnóstico da pecuária de leite nacional. 2011. disponível em: <https://www.bibliotecaagppta.org.br/zootecnia/bovinocultura/livros/diagnostico%20da%20pecuaria%20de%20leite%20nacional.pdf>. acesso em 22/09/2021.