

DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS E CORONAVÍRUS EM FEZES DE BEZERROS NEONATOS COM DIARRÉIA CRIADOS EM VÁRIOS MUNICÍPIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

J.A. Jerez¹, P.E. Brandão¹, M.G. Buzinaro², F. Gregori¹, C.A.R. Rosales¹, F.H. Ito¹, T. Sakai³

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ/USP, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 005508-900, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: jajerez@usp.br

RESUMO

Estudou-se a ocorrência dos rotavírus e dos coronavírus em propriedades de criação de gado bovino leiteiro, localizadas em diversos Municípios do Estado de São Paulo, a partir de amostras fecais diarréicas de bezerros, utilizando como provas diagnósticas a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e hemaglutinação (HA) / inibição da hemaglutinação (HI), respectivamente para rotavírus e coronavírus. Das 72 amostras fecais, 14% delas apresentaram-se positivas para os rotavírus do sorogrupo A e 39% para coronavírus. Em uma propriedade foram detectadas co-infecções de rotavírus e coronavírus em dois (3%) bezerros. Estes achados confirmaram a participação dos rotavírus e coronavírus na etiologia das diarréias de bezerros na área estudada.

PALAVRAS-CHAVE: Rotavírus, coronavírus, ocorrência, diarréia, bezerros.

ABSTRACT

The occurrence of coronavirus and rotavirus was surveyed using 72 diarrheic stool specimens from calves reared in 12 municipalities of São Paulo State, using haemagglutination (HA) / haemagglutination inhibition (HI) and Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE), respectively, for the detection of these agents. An amount of 14% of the samples were positive for serogroup A rotavirus and 39% were positive for Coronavirus. In one farm it was found a rotavirus/coronavirus co-infection in 2 calves (3%). These results confirmed the participation of rotavirus and coronavirus in the etiology of neonatal calf diarrhea in the surveyed area.

KEY WORDS: Rotavirus, coronavirus, occurrence, diarrhea, calves.

INTRODUÇÃO

Os rotavírus foram inicialmente descritos por MEBUS *et al.* (1969) e os coronavírus por MEBUS *et al.* (1973), sendo atualmente reconhecidos como os vírus mais importantes envolvidos na etiologia das diarréias neonatais dos bezerros (BABIUK *et al.*, 1985; SNODGRASS *et al.*, 1986; ESTES, 1996).

Os prejuízos econômicos por esses agentes são bastante elevados: os coronavírus acarretam em média 16,7 a 28,4 milhões de dólares/ano, enquanto que os rotavírus variam de 3,1 a 8,7 milhões de dólares/ano (HOUSE, 1978).

Para o diagnóstico laboratorial desses dois importantes agentes deve-se utilizar métodos de diagnóstico que permitam a identificação no próprio material

fecal, dada a dificuldade de isolamento dos mesmos (REYNOLDS *et al.*, 1984; ESTES, 1996).

Os rotavírus podem ser detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), que permite a identificação através do perfil eletroforético de migração do RNA viral, de cadeia dupla e segmentado, em quatro agregados de migração bem característico (HERRING *et al.*, 1982).

Já os coronavírus apresentam atividade hemaglutinante com hemácias de hamster, cobaio, rato e camundongo (SATO *et al.*, 1977), assim, o diagnóstico laboratorial pode ser realizado por hemaglutinação (HA), seguida da confirmação por inibição da hemaglutinação (HI).

No presente trabalho estudou-se a participação dos rotavírus e dos coronavírus em quadro clínico de

¹Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal/FMVZ/Universidade de São Paulo.

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal/FCAV, UNESP Jaboticabal.

³Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, College of Bioresource Sciences, Nihon University.

diarréia em bezerros neonatos, em diversas propriedades de criação de gado bovino leiteiro, localizadas em diversos Municípios do Estado de São Paulo.

MATERIALE MÉTODOS

a) Amostras de fezes: foram analisadas 72 amostras de material fecal de bezerros com quadro clínico de diarréia, entre 1 e 37 dias de idade, provenientes de 16 propriedades de criação de gado bovino leiteiro, localizadas em 12 municípios do Estado de São Paulo, compreendendo Altinópolis, Bragança Paulista, Brodosqui, Colina, Cravinhos, Jaboticabal, Limeira, Ribeirão Preto, Sales de Oliveira, Taiaçú, Terra Roxa e Viradouro.

b) Amostra padrão de rotavírus: utilizou-se a amostra NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus) de rotavírus bovino, pertencente ao sorogrupo A do gênero *Rotavirus*, adaptada ao cultivo em cultura de células da linhagem MA₁₀₄ (rim fetal de macaco Rhesus), provenientes do College of Bioresource Sciences, Nihon University.

c) Amostra padrão de coronavírus: utilizou-se a amostra Kakegawa de coronavírus bovino, adaptada ao cultivo em células da linhagem HmLu-₁ (pulmão de hamster), provenientes do College of Bioresource Sciences, Nihon University.

d) Soro padrão anti-coronavírus: soro de coelho hiperimunizado com uma preparação semi-purificada da amostra Kakegawa de coronavírus bovino, previamente preparado no Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ/USP.

e) Detecção de rotavírus: foram detectados por PAGE, de conformidade com a metodologia preconizada por HERRING *et al.* (1982), com algumas modificações. A suspensão fecal foi realizada em tampão TRIS 0,1 M e pH 7,3; após tratamento com Freon T.F., a extração do RNA viral foi feita pelo tratamento fenol/clorofórmio seguida de etanol a -20°C durante uma noite; a sedimentação foi realizada por centrifugação a 20000g durante 30 minutos. A eletroforese foi realizada em sistema descontínuo, usando-se um gel de corrida a 7,5% e de empilhamento a 3,5%, previamente formados na espessura de 1 mm entre placas de vidro de 9,5x9,5 cm. A corrida foi realizada a 20 mA durante, aproximadamente, 2 horas e a coloração com nitrato de prata 0,011M.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram o mesmo padrão de migração eletroforética da amostra NCDV.

f) Detecção de coronavírus: foram detectados por hemaglutinação (HA), com hemácias de hamster e confirmados por inibição da hemaglutinação (HI), seguindo-se a metodologia preconizada por SATO *et al.* (1977), com algumas modificações.

A suspensão fecal foi realizada em tampão PBS 0,01 M pH 7,2 com 0,1% de BSA (soro albumina bovina). Em placas de microtitulação com 96 cavidades e fundo em "U", realizaram-se as diluições seriadas de 1/2 a 1/1024, em volume de 25µl, reservando-se cavidades para controle positivo (amostra Kakegawa) e negativo (apenas hemácias). Após a diluição, adicionaram-se em todas as cavidades 25 µl de uma suspensão de hemácias de hamster a 0,4% em tampão PBS 0,01 M pH 7,2 com 0,1% de BSA. Decorrido um período de incubação de 2 horas em temperatura ambiente procedeu-se a leitura, sendo o título considerado como a recíproca da maior diluição na qual se observou hemaglutinação completa. Amostras com título hemaglutinante (T_{HA}) maior ou igual a 4 foram submetidas à inibição da hemaglutinação para confirmação dos resultados.

Para retirada dos inibidores inespecíficos, o soro hiperimune anti-coronavírus foi tratado com uma solução de caolim-25% em tampão borato 0,5 M pH 9,0 e inativado a 56°C durante 30 minutos. Após centrifugação a 1.000g durante 10 minutos, o sobrenadante foi tratado com "papa" de hemácias de hamster durante 1 hora em banho de gelo, para a retirada das hemaglutininas inespecíficas. Os eritrócitos foram removidos por centrifugação a 1.000 g durante 5 minutos.

Para a realização da HI procedeu-se a diluição das amostras com os procedimentos idênticos aos da HA, utilizando-se microplacas com fundo em "V". A seguir adicionaram-se 25µl de soro hiperimune previamente tratado e na diluição ótima para conter entre 4 e 8 unidades inibidoras da hemaglutinação. A mistura foi incubada em estufa 37°C durante uma hora, para interação antígeno-anticorpo. Decorrido esse período, adicionaram-se 25 µl de suspensão de hemácias de hamster a 0,4% em PBS 0,01 M pH 7,2 com 0,1% de BSA em todas as cavidades. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, procedeu-se a leitura. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram queda no título em, no mínimo, 4 UHA.

Para avaliação da reprodutibilidade dos resultados de HA e HI, cada amostra foi testada, no mínimo, duas vezes em duplicata.

RESULTADOS

Das 72 amostras de fezes analisadas, 10 (14%) foram positivas para rotavírus, sendo que todas elas apresentaram migração eletroforética compatível com o perfil

eletroforético do sorogrupo A de rotavírus. Um total de 51 (71%) apresentaram atividade hemaglutinante, porém apenas 37 (51%) apresentaram título $T_{HA}=4$, as quais foram submetidas à confirmação por HI, tendo sido confirmada a presença de coronavírus em 28 (39%) destas. Em apenas uma das propriedades amostradas pôde ser detectada a presença concomitante de rotavírus e de coronavírus em material fecal proveniente de dois animais e na mesma faixa etária (7 dias).

Portanto, 11% das amostras foram positivas somente para rotavírus (8/72), 36% somente para coronavírus (26/72), 3% apresentaram infecção associada (2/72) e 50% foram negativas para a presença dos dois vírus estudados (36/72).

Os resultados de PAGE, HA e HI por faixa etária, propriedades e localização em diferentes Municípios podem ser melhor visualizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultado das provas de PAGE, para diagnóstico de rotavírus e de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI) para o diagnóstico de coronavírus a partir de material fecal de bezerros com quadro clínico de diarreia, segundo a faixa etária e os Municípios onde se localizam as propriedades de criação, São Paulo - 2001.

N	Faixa etária	Propriedade	Município	Rotavírus	Coronavírus		
					HA	HI	Resultado
1	30 dias	A	Altinópolis	Negativo	4	2	Negativo
2	30 dias	A	Altinópolis	Negativo	16	2	Positivo
3	30 dias	A	Altinópolis	Negativo	0	.x.	Negativo
4	37 dias	B	Altinópolis	Negativo	8	4	Negativo
5	27 dias	B	Altinópolis	Negativo	16	4	Positivo
6	30 dias	B	Altinópolis	Negativo	8	4	Negativo
7	15 dias	B	Altinópolis	Negativo	2	.x.	Negativo
8	31 dias	B	Altinópolis	Negativo	4	0	Positivo
9	30 dias	A	Bragança Paulista	Positivo	0	.x.	Negativo
10	30 dias	A	Bragança Paulista	Negativo	0	.x.	Negativo
11	7 dias	A	Bragança Paulista	Negativo	0	.x.	Negativo
12	7 dias	A	Bragança Paulista	Negativo	0	.x.	Negativo
13	20 dias	A	Brodosqui	Negativo	16	2	Positivo
14	20 dias	A	Brodosqui	Negativo	8	0	Positivo
15	20 dias	A	Brodosqui	Negativo	0	.x.	Negativo
16	9 dias	A	Colina	Negativo	4	0	Positivo
17	9 dias	A	Colina	Negativo	4	0	Positivo
18	21 dias	A	Colina	Negativo	4	0	Positivo
19	30 dias	A	Colina	Negativo	4	0	Positivo
20	30 dias	A	Colina	Negativo	8	2	Positivo
21	30 dias	A	Colina	Negativo	4	0	Positivo
22	30 dias	A	Colina	Negativo	4	0	Positivo
23	15 dias	A	Colina	Negativo	2	.x.	Negativo
24	15 dias	A	Colina	Negativo	0	.x.	Negativo
25	15 dias	A	Colina	Negativo	0	.x.	Negativo
26	10 dias	A	Colina	Positivo	0	.x.	Negativo
27	10 dias	A	Colina	Negativo	0	.x.	Negativo
29	20 dias	A	Colina	Negativo	0	.x.	Negativo
29	30 dias	A	Colina	Negativo	0	.x.	Negativo
30	15 dias	A	Colina	Positivo	2	.x.	Negativo
31	8 dias	A	Cravinhos	Negativo	4	0	Positivo
32	4 dias	A	Cravinhos	Negativo	16	2	Positivo
33	12 dias	A	Cravinhos	Negativo	4	0	Positivo
34	8 dias	A	Cravinhos	Negativo	2	.x.	Negativo
35	25 dias	B	Cravinhos	Negativo	4	0	Positivo
36	31 dias	B	Cravinhos	Negativo	2	.x.	Negativo
37	13 dias	A	Jaboticabal	Negativo	2	.x.	Negativo
38	12 dias	A	Limeira	Negativo	32	4	Positivo
39	8 dias	A	Limeira	Negativo	2	.x.	Negativo
40	7 dias	A	Limeira	Negativo	16	2	Positivo
41	7 dias	A	Limeira	Positivo	4	0	Positivo
42	7 dias	A	Limeira	Negativo	0	.x.	Negativo
43	7 dias	A	Limeira	Positivo	8	0	Positivo

Continuação da Tabela 1

N	Faixa etária	Propriedade	Município	Rotavírus	Coronavírus		
					HA	HI	Resultado
44	7 dias	A	Limeira	Positivo	2	.x.	Negativo
45	6 dias	A	Limeira	Negativo	2	.x.	Negativo
46	8 dias	A	Limeira	Negativo	0	.x.	Negativo
47	6 dias	A	Limeira	Negativo	2	.x.	Negativo
48	8 dias	A	Limeira	Positivo	0	.x.	Negativo
49	5 dias	A	Limeira	Negativo	4	2	Negativo
50	10 dias	A	Limeira	Negativo	4	0	Positivo
51	5 dias	A	Limeira	Negativo	32	4	Positivo
52	5 dias	A	Limeira	Negativo	2	.x.	Negativo
53	26 dias	A	Ribeirão Preto	Negativo	16	4	Positivo
54	13 dias	A	Ribeirão Preto	Negativo	16	0	Positivo
55	7 dias	A	Ribeirão Preto	Negativo	32	4	Positivo
56	1 dia	A	Ribeirão Preto	Negativo	4	0	Positivo
57	19 dias	A	Ribeirão Preto	Negativo	0	.x.	Negativo
58	7 dias	A	Ribeirão Preto	Negativo	0	.x.	Negativo
59	20 dias	A	Sales de Oliveira	Negativo	4	2	Negativo
60	30 dias	A	Sales de Oliveira	Negativo	4	2	Negativo
61	30 dias	A	Sales de Oliveira	Negativo	2	.x.	Negativo
62	22 dias	A	Taiacu	Negativo	4	2	Negativo
63	20 dias	A	Taiacu	Positivo	2	.x.	Negativo
64	20 dias	A	Taiacu	Negativo	0	.x.	Negativo
65	20 dias	A	Taiacu	Positivo	0	.x.	Negativo
66	20 dias	A	Taiacu	Negativo	2	.x.	Negativo
67	15 dias	B	Taiacu	Negativo	0	.x.	Negativo
68	15 dias	A	Terra Roxa	Negativo	0	.x.	Negativo
69	10 dias	A	Viradouro	Positivo	4	2	Negativo
70	1 dia	A	Viradouro	Negativo	512	32	Positivo
71	22 dias	A	Viradouro	Negativo	16	4	Positivo
72	5 dias	B	Viradouro	Negativo	4	2	Negativo

DISCUSSÃO

Os rotavírus e os coronavírus tem sido apontados como os dois principais agentes na etiologia viral da diarreia dos bezerros neonatos (BABIUK *et al.*, 1985; SNODGRASS *et al.*, 1986; ESTES, 1996).

No Estado de São Paulo, a participação dos rotavírus já foi descrita em várias regiões (JEREZ *et al.*, 1987; MUNFORD *et al.*, 1995; BUZINARO & JEREZ, 1998), entretanto, até o presente momento a detecção de coronavírus bovino ainda não foi descrita em território nacional.

Para o diagnóstico de rotavírus, optou-se pela PAGE, que tem como principal vantagem a detecção de rotavírus de todos os sorogrupos, uma vez que não depende da interação antígeno-anticorpo, visto tratar-se de uma metodologia baseada na detecção do RNA viral (HERRING *et al.*, 1982; ESTES, 1996). No presente trabalho, foi verificada apenas a participação de rotavírus compatível com o padrão de migração eletroforética do sorogrupo A de rotavírus, semelhante à amostra NCDV, em 10 (14%) das amostras estudadas.

O diagnóstico de coronavírus pode ser realizado por hemaglutinação (SATO *et al.*, 1977), microscopia eletrônica e ELISA (REYNOLDS *et al.*, 1984). No presente estudo optou-se pelos métodos HA/HI pela simplicidade e baixo custo operacional, possibilitando o processamento de um grande número de amostras em curto período de tempo.

Ressalte-se que o diagnóstico de coronavírus pela reação de HA isoladamente não se constitui em uma metodologia suficientemente segura para o diagnóstico laboratorial, uma vez que nem todas as amostras que apresentaram atividade hemaglutinante confirmaram a presença de partículas virais quando submetidas a reação de HI. Das 51 amostras com título hemaglutinante maior ou igual a 4, apenas 28 puderam ser confirmadas como positivas quando submetidas à inibição da hemaglutinação.

Ao se analisarem os resultados, verificou-se que duas amostras (3%) foram positivas para rotavírus e coronavírus simultaneamente, sendo ambas oriundas de uma mesma propriedade e de animais na mesma faixa etária (7 dias).

Embora não se possa aplicar uma metodologia estatística, dado o número de amostras estudadas (72 amostras), pode-se inferir que os coronavírus apresentaram frequência de ocorrência maior de que os rotavírus. Essa afirmação, entretanto, requer muita precaução, mas chama a atenção para que mais estudos acerca da participação dos coronavírus nas diarreias dos bezerros neonatos sejam realizados, a fim de que se possa avaliar a real magnitude do problema.

Além disso, convém lembrar que os coronavírus estão, também, envolvidos em processos respiratórios, com infecção assintomática, podendo ser eliminados através das fezes (SAIF *et al.*, 1986). Desse modo, é necessário que outros estudos sejam realizados para sabermos se a eliminação fecal das partículas virais que se reduplicam no trato respiratório podem ser suficientes ou não para apresentar “sinal” nas reações utilizadas (HA e HI), que são classificadas como reações de baixa sensibilidade. Caso tal hipótese seja confirmada, serão necessários métodos que permitam a diferenciação entre amostras fecais e respiratórias de coronavírus bovino.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BABIUK, L.A.; SABARA, M.; HUDSON, G.R. Rotavirus and coronavirus infections in animals. *Progr Vet. Microbiol Immunol.*, v. 1, p. 80-120, 1985.
- BUZINARO, M. G. & JEREZ J.A. Caracterização eletroforética de rotavírus em rebanhos leiteiros na região Nordeste do Estado de São Paulo. *Ars Vet.*, v. 14, n. 2, p. 193-200, 1998.
- ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Virology*. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. 2.950p.
- HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.
- HOUSE, J.A. Economic impact of rotaviruses and other neonatal disease agents of animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 173, n. 5, p. 573-576, 1978.
- JEREZ, J.A.; CANDEIAS, J.A. N.; RÁCZ, M. L.; DURIGON, E. L. Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarreicas de bezerros. *Revista de Microbiol.*, v. 18, n. 3, p.201-204, 1987.
- MEBUS, C.A; UNDERDAHL, N.R.; RHODES, M.B.; TWIEHAUS, M.J. Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from field outbreak. *Nebr. Agric. Experimental Stn Bull.*, n.233, p. 1-16,1969.
- MEBUS, C. A.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Neonatal calf diarrhea: Propagation, attenuation and characteristics of a corona-like agent. *Am. J. Vet. Res.*, v. 34, p. 173-178, 1973.
- MUNFORD, V. Cultivo e caracterização sorológica de rotavírus no Estado de São Paulo. São Paulo: 1995. 98p. [Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
- REYNOLDS, D.J.; CHASEY, D.; SCOTT, A.C.; BRIDGER, J.C. Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces. *Vet. Rec.*, v. 114, p. 397-401, 1984.
- SAIF, L.J.; REDMAN, D.R.; THEIL, K.W. Experimental coronavirus infection in calves: Viral replication in the respiratory and intestinal tracts. *Am. J. Vet. Res.*, v. 47, p. 1426-1432, 1986.
- SATO, K.; INABA, Y.; KUROGI, H.; TAKAHASHI, E.; SATODA, K.; OMORI, T.; MATUMOTO, M. Hemagglutination by calf diarrhea coronavirus. *Vet. Microbiol.*, v.2, p.83-87, 1977.
- SNODGRASS, D. R.; TERZOLO, H. R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J. D.; SYNGE, B. A. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Vet. Rec.*, v. 119, p. 31-34, 1986.

Recebido em 26/12/01

Aceito em 19/2/02