

ROTAVIRUS EM SUÍNOS NA REGIÃO SUL DO BRASIL¹

PAULO M. ROEHE², AUGUSTO C. CUNHA², ELIANE O. SALVO², RICARDO M. MARTINS²,
JULIO C. A. ROSA², LILIANE G. OLIVEIRA² e VILMA L. HOFFMANN²

ABSTRACT.- Roehoe P.M., Cunha A.C., Salvo E.O., Martins R.M., Rosa J.C.A., Oliveira L.G. & Hoffman V.L. 1989. [Rotavirus in swine in the southern region of Brazil.] Rotavirus em suínos na região sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 9(3/4):45-49. Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Cx. Postal 2076, Porto Alegre, RS 90001, Brazil.

The occurrence of rotavirus infection was studied in faeces of diarrhoeic swine in 32 farms of 22 municipalities from the states of Rio Grande do Sul and Santa Catarina. From a total number of 231 faecal samples collected from piglets aging 1 to 60 days, 43 (18.6%) were positive by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and 42 (17.7%) were positive by an enzyme immunoassay (ELISA). With the exception of 1 sample, the electropherotypes observed were consistent with the description of classical group A rotavirus. In 5 samples rotavirus was detected by ELISA and not by PAGE, whereas the inverse occurred in 7 samples. Studies with faecal dilutions of positive faeces demonstrated that the discrepancies probably were not due to differences in virus concentration. The presence of IgG was confirmed in one sample PAGE positive - ELISA negative, suggesting the presence of immune complexes that may have interfered in the results obtained. Bacteriological and parasitological examinations in 75 samples showed the presence of enteropathogenic *Escherichia coli* in 8 (10.7%) samples and *Treponema hyodysenteriae* in 6 (8%). In no sample were parasites detected. In only one sample *E. coli* and rotavirus were detected together, suggesting low incidence of the association bacteria-viruses. However, the severity of the outbreak where association was detected was greater than in the others. The age distribution of rotavirus infection in the piglets showed that 90% occurred in animals between 15 and 30 days old.

INDEX TERMS: Rotavirus, swine, diagnostic methods, occurrence.

SINOPSE. -A ocorrência de infecção por rotavirus foi estudada em granjas de suínos acometidos de diarreia em 32 propriedades de 22 municípios do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. De um total de 231 amostras fecais coletadas de leitões na faixa etária de 1 a 60 dias, 43 (18,6%) foram positivas pela técnica de eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) e 42 (17,7%) pelo ensaio imunoenzimático (ELISA). Com a exceção de um caso, os eletroferotipos observados foram consistentes com a descrição dos rotavirus "clássicos" do grupo A. Em 5 amostras o rotavirus foi detectado por ELISA e não por PAGE, enquanto que a situação inversa ocorreu em 7 casos. Estudos com diluições de fezes positivas demonstraram que as discrepâncias observadas provavelmente não foram devidas a diferenças nas concentrações de vírus. A presença de IgG foi verificada em uma amostra PAGE positiva ELISA negativa, sugerindo a presença de complexos imunes que poderiam ser a causa de discrepâncias

entre os métodos de diagnóstico. Exames bacteriológicos e parasitológicos em 75 amostras revelaram a presença de *Escherichia coli* enteropatogênica em 8 (10,7%) e *Treponema hyodysenteriae* em 6 (8%). Em nenhum caso foram detectados parasitos. Em somente um caso *E. coli* foi encontrada em associação com rotavirus, que clinicamente mostrou maior gravidade do que nos demais. A distribuição da infecção por faixas etárias revelou que 79% dos casos foram verificados em animais de 15 a 30 dias.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Rotavirus, suínos, métodos de diagnóstico, ocorrência.

INTRODUÇÃO

Os rotavirus têm sido responsabilizados como causa de enterite neonatal em uma ampla variedade de espécies (McNulty 1978). Desde a primeira descrição em suínos (Rodger et al. 1975) e várias outras subsequentes (Woode et al. 1976, Leece et al. 1976, McNulty et al. 1976, Bohl et al. 1978, Utreba et al. 1984), a importância desse agente como causa de diarreia em leitões tem sido pesquisada. Dados sobre infecção por rotavirus em suínos no

¹ Aceito para publicação em 17 de maio de 1988.

Trabalho executado com fundos de Auxílio a Pesquisa do CNPq, Proc. 404890/86-VT e Bolsa de Pesquisa 301706/86-VT.

² Equipe de Virologia e Imunologia, Instituto de Pesquisas Veterinárias "Desidério Finamor" (IPVDF), Caixa Postal 2076, Porto Alegre, RS 90001.

Brasil são ainda escassos. Os primeiros relatos foram publicados recentemente (San Juan et al. 1985, Roche et al. 1985).

No presente trabalho são descritos os resultados da ocorrência do rotavírus em fezes diarréicas de leitões em 20 municípios do Estado do Rio Grande do Sul e 2 municípios do Estado de Santa Catarina. Concomitantemente aos dados epidemiológicos, buscou-se uma análise da metodologia empregada na pesquisa desse agente, avaliando comparativamente um teste imunoenzimático (ELISA) e a eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE).

MATERIAL E MÉTODOS

Duzentas e trinta e uma amostras de fezes de suínos na faixa etária de 1 a 60 dias foram coletadas em 32 propriedades em 22 municípios, sendo 20 no Estado do Rio Grande do Sul e 2 no Estado de Santa Catarina. As condições de manejo de cada propriedade eram variáveis, porém a maioria dos produtores utiliza a cria de leitões até 60 dias de idade junto com as porcas e a partir dessa idade os animais são transferidos para unidades de engorda. Os leitões cujas fezes foram coletadas apresentavam clinicamente uma diarreia suave de coloração variável, à exceção de uma propriedade onde foi evidenciada severa diarreia e perda de leitões, com mortalidade em torno de 10%.

Todas as amostras foram testadas pela técnica de eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE), executada como descrito por Pereira et al. (1985). Resumidamente, suspensões de fezes a 10-20% em solução salina tamponada (PBS) pH 7,2 foram preparadas e clarificadas por centrifugação a 1500 x g por 10 minutos. Sódio dodecil sulfato (SDS) foi adicionado a uma concentração final de 1% e incubado a 37°C por 30 minutos. Após extração por fenol-clorofórmio, o RNA foi precipitado com etanol a -20°C por 18 horas, seco e resuspendido em 20 microlitros de tampão de suspensão de Laemli (Laemli 1970). A eletroforese foi executada em géis de poli-acrilamida (3,5% para o gel de concentração, 7,5% para o gel de separação) de acordo com Laemli (1970). As corridas eletroforéticas foram realizadas a 10 mA por 18 horas. A coloração dos géis foi executada com nitrato de prata como descrito por Herring et al. (1982). O teste imunoenzimático (ELISA) foi realizado em 163 amostras utilizando-se um ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus (EIA-RA), gentilmente fornecido pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro. As amostras foram processadas pelo sistema de "sanduíche duplo", como descrito por Pereira et al. (1985).

Para o estudo de diluições das amostras, as mesmas foram diluídas em séries de base 2 e processadas por PAGE e ELISA como descrito acima.

Setenta e cinco amostras foram processadas paralelamente por exames bacteriológicos e parasitológicos, como descrito por Barcellos et al. (1980) e Ueno & Gutierrez (1982).

A ocorrência da infecção por rotavírus em relação à faixa etária foi representada em forma gráfica.

A detecção de imunoglobulinas G (IgG) foi executada como segue: suspensões fecais foram diluídas 1:4 em tampão carbonato (pH 9,6) e colocadas nas placas de ELISA overnight a 4°C. Conjugado Proteína A (*Staphylococcus aureus* prot. A, SIGMA) - Peroxidase (Horseradish Peroxidase Tipo VI, SIGMA) foi produzido de acordo com o método descrito por Yolkar & Leister (1981). O conjugado foi titulado e uma diluição apropriada foi acrescida às placas após 3 lavagens com solução salina tamponada

com fosfato (pH 7,4) acrescida de 0,5% Tween-20 (PBS-T). Demais procedimentos para a realização da prova (OPD, H₂O₂, H₂SO₄) foram realizados como anteriormente (Pereira et al. 1985).

RESULTADOS

Os municípios onde foram realizadas coletas estão registrados no Quadro 1. Em 16 (72,7%) dos 22 municípios foram evidenciados casos de infecção por rotavírus. O número de amostras por municípios variou de 1 a 34, dependendo do número de propriedades visitadas e da presença ou ausência de leitões diarréicos.

Quadro 1. Municípios onde foram efetuadas coletas de fezes diarréicas de suínos e número de amostras positivas para rotavírus

Municípios	Nº de amostras	Nº positivas
Santa Rosa	34	4
Porto Alegre	17	2
Roca Sales	7	2
Viamão	9	2
Camaquã	4	-
Muçum	52	15
Cruzeiro do Sul	3	1
Bom Retiro	4	-
Teutônia	11	1
Casca	6	1
Guaporé	10	5
Serafina Correa	8	3
Encantado	1	1
Erexim	12	7
Gaurama	10	4
Getúlio Vargas	13	1
Severiano de Almeida	8	-
Nova Aracá	1	-
Passo Fundo	3	-
Estrela	1	-
Criciúma ^(a)	2	1
Xanxerê ^(a)	14	5
Total	230	55

(a) Município do Estado de Santa Catarina.

Quadro 2. Estudo comparativo dos testes de PAGE e ELISA (164 amostras)

PAGE	ELISA		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	36	7	43
Negativo	5	116	121

Do total de 231 amostras examinadas, rotavírus foi identificado em 43 (18,6%) por PAGE ou ELISA. Nas 164 amostras examinadas pelos dois métodos (Quadro 2), PAGE detectou 43 (26,2%) enquanto que o ELISA detectou 41 (25%). Sete das amostras PAGE positivas foram ELISA negativas, enquanto que 5 das amostras ELISA positivas foram PAGE negativas. Coincidência de resultados positivos foi observada em 37 amostras.

Os eletroferotipos observados estão exemplificados na Fig. 1 (A, B, C). Os perfis eletroforéticos de 42 das amostras PAGE positivas podem ser classificadas como grupo A (Snodgrass et al. 1984). A amostra representada na Fig. 1 (A') representa o perfil eletroforético da amos-

Quadro 3. Resultados de testes de ELISA e PAGE com diluições de amostras de rotavírus

Amostras locais de fezes de suínos	ELISA						PAGE					
	Diluições da suspensão fecal						Diluições da suspensão fecal					
	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
BV 389	+(a)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	±
M 15	+	+	+	+	±	-	+	+	+	+	±	-
Pe 730	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	±	-
C6d	+	+	+	+	-	-	+	+	±	-	-	-
A 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±

(a) + = Resultado positivo;
 - = Resultado negativo;
 ± = Resultado fracamente positivo.

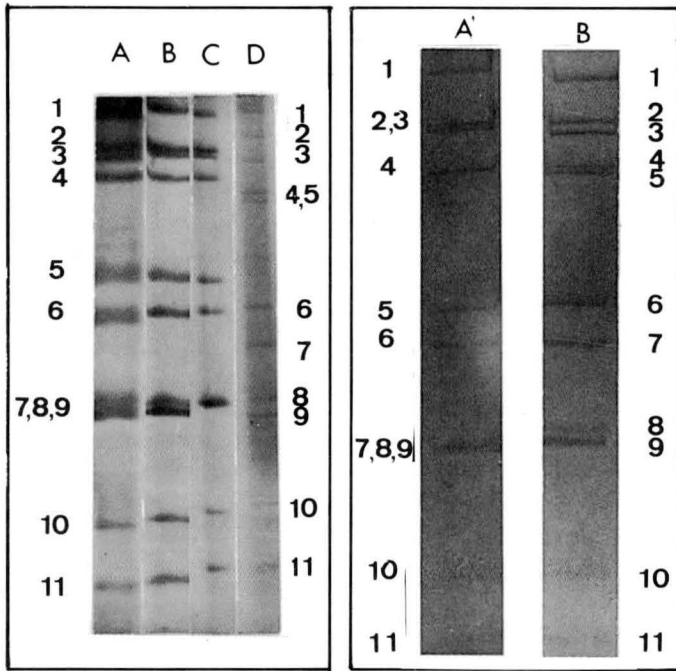


Fig. 1. Eletroferotipos representativos da maioria das amostras de campo isoladas. (A) EVI 64; (B) EVI 85; (C) EVI 67; (D) Eletroferotipo atípico de rotavírus aviário incluído para comparação; (A') M 15; (B') BV 389 (amostra de rotavírus suíno com perfil atípico). Os números representam os segmentos de RNA detectados. As amostras A, B, C e D foram corridas no mesmo gel.

tra M15 (A') onde os segmentos 2 e 3 do ARN migraram acentuadamente próximos um do outro. Na amostra BV389 (B') evidencia-se um perfil eletroforético atípico onde um segmento extra revelou um peso molecular estimativo levemente menor que o segmento 4.

O estudo de diluições das amostras está representado no Quadro 3. Não foi observada influência significativa das diferentes diluições das amostras nos resultados comparados de PAGE e ELISA. Nas 75 amostras processadas paralelamente por exames bacteriológicos e parasitológicos, *Escherichia coli* foi detectada em cultura pura em 2 epidódios, representando 10,6% das amostras comparadas e *Treponema hyodysenteriae* em 8% das amostras. Em somente uma amostra foi detectada infecção mista rotavírus - *E. coli*. Nenhuma associação com outras bactérias ou parasitos foi encontrada.

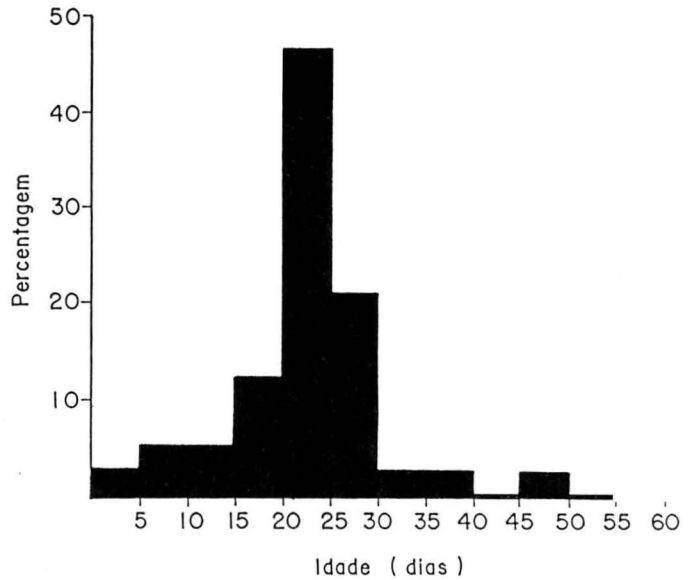


Fig. 2. Percentagem de suínos positivos para rotavírus em relação à idade (n=43).

A ocorrência da infecção em relação à faixa etária está representada na Fig. 2. Setenta e nove por cento dos casos foram verificados em animais de 15 a 30 dias de idade.

DISCUSSÃO

Rotavírus foi identificado em fezes de suínos provenientes da maioria dos municípios onde foram realizadas coletas, embora não em todas as propriedades coletadas. Isto evidencia a ampla distribuição do rotavírus na região. Dados similares haviam sido registrados no Estado de São Paulo (San Juan et al. 1985) e em outros países (Bohl 1979).

Na maioria dos eletroferotipos obtidos com os RNAs virais das amostras, observa-se como característica mais marcante uma alteração na migração do segmento 3, representando um fragmento de peso molecular um pouco maior do que o observado com a amostra SA-11. Perfis similares a estes foram registrados por Theil et al. (1981), Woode et al. (1976) e San Juan et al. (1986).

Nas 43 amostras positivas observadas, apenas a amostra BV389 (Fig. 1 (B')) é notavelmente atípica, pela migração de um segmento extra junto aos segmentos 2, 3 e

4. Interessante ainda é o fato de que uma migração similar em relação ao grupo de ARNs de maior peso molecular foi observado com a amostra de rotavírus aviário (Fig. 1-D). A possibilidade de contaminação com vírus de uma ou outra amostra, no caso, é remotíssima, tendo em vista que ambas foram isoladas de diferentes localidades e com mais de 8 meses de intervalo entre o processamento das mesmas. Uma questão que surge é a possibilidade da infecção de suínos com vírus aviário, ou vice-versa. No entanto, até onde foi possível detectar, não havia nas propriedades de onde tais amostras se originaram, criações concomitantes de suínos e aves. Por outro lado, a migração dos segmentos 1, 2 e 3 de ambas amostras permite assumir que se tratam de vírus distintos, embora as corridas representadas na Fig.1 não correspondam a um mesmo gel.

Explicações para as diferenças na sensibilidade dos métodos de PAGE e ELISA têm sido baseadas ou na presença de complexos imunes, ou em diferenças na concentração de vírus das amostras, ou ainda na ausência de antígeno grupo específico.

A presença de complexos imunes pré-formados poderia levar a um resultado negativo no teste de ELISA, pela ausência de sítios combinatórios disponíveis para a captura do antígeno pelos anticorpos ou para a fixação dos anticorpos detectores, no sistema de "sanduíche duplo" (Pereira et al. 1985).

Usando-se um teste modificado onde se buscou a fixação das imunoglobulinas G (IgG) porventura existentes nas fezes, foi possível detectar uma amostra onde as IgGs estavam presentes. Embora o sistema utilizado não permita afirmar a respeito da especificidade das IgGs encontradas nas fezes, a presença do quadro clínico associado à identificação do vírus por eletroforese e à presença de IgGs dão fortes indícios de que poderiam estar presentes complexos imunes rotavírus - IgGs pré-formados nesta amostra.

Por outro lado, a maioria das imunoglobulinas detectáveis em fezes de suíno são pertencentes à classe IgA (Carthier & Franz 1981). Trabalhos estão em andamento visando avaliar a importância da presença de IgA e IgM nas fezes como fatores comprometedores dos resultados dos testes de ELISA.

Quanto a possibilidade de discrepância devido à concentração de vírus nas fezes, os experimentos descritos indicam que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos após sucessivas diluições das fezes. Tanto o teste de PAGE como o de ELISA se portaram de maneira similar a esse respeito. Conseqüentemente, as diferenças podem ser explicadas pelas seguintes alternativas: a) presença de complexos imunes (sendo a maioria com imunoglobulinas de classes A ou M; b) ausência de antígeno grupo-específico nas amostras em questão.

A situação reversa (ELISA positivo x PAGE negativo) poderia ser explicada por uma baixa concentração de vírus nas amostras. Os resultados com diluições sucessivas de fezes positivas indicam que os dois métodos apresen-

tam sensibilidade similar após sucessivas diluições das amostras. Portanto, as diferenças aqui obtidas aparentemente não se originaram por diferenças na concentração de vírus das mesmas.

Portanto um novo problema surge na análise das amostras ELISA positivas e PAGE negativas. Se for considerado que a concentração de vírus não foi fator de diferença de sensibilidade no sistema de trabalho, as únicas possibilidades para que tal resultado não ocorra são: a) degradação do ARN viral nas amostras; ou b) erro técnico durante o processamento.

A probabilidade da degradação do ARN já foi levantada por outros autores (San Juan et al. 1986). No entanto, a hipótese de erro técnico durante o preparo das amostras permanece presente, embora pouco provável devido ao exaustivo número de repetições executadas.

Em relação à faixa etária de maior incidência da infecção por rotavírus, os dados do trabalho estão de acordo com os observados por outros autores (Bohl 1979, San Juan et al. 1985) não havendo na área estudada, diferença significativa em relação a outras regiões do País e exterior. Com relação ao caso onde foi detectada associação *E. coli* - rotavírus, a incidência de diarreia na propriedade de origem das amostras era bastante alta, havendo inclusive mortalidade de leitões, embora não quantificada precisamente. A manifestação clinicamente mais grave desse surto sugere uma maior importância das associações de agentes de diarreias, embora durante o estudo essa associação tenha ocorrido em somente um episódio, indicando uma baixa incidência desses casos.

Agradecimentos.- Os autores agradecem a cooperação de todos que auxiliaram na coleta de amostras, em especial ao Dr. Roque Pês (Inspetoria Veterinária de Erechim, RS) e Dr. Fred (Cosuel, Encantado, RS). Agradecimentos também são devidos aos funcionários Terezinha Souza da Rosa, Marinês Terezinha de Azeredo Santos, Lídia Terezinha O. Mallet e Antonio Carlos da Silva; à Dra. Iracema Candida Silva Santos pelos exames parasitológicos e Gilda Scaranari Simões Pires pelo trabalho de datilografia.

REFERÊNCIAS

- Barcellos D.E.S.N., Guizzardi I.I. & Fallavena L.C.B. 1980. Frequência e causas de diarreia bacteriana em suínos nas zonas criatórias do Vale do Taquari e Missões, Rio Grande do Sul. Bolm Inst. Pesq. Vet. Desidério Finamor, Porto Alegre, 7:27-37.
- Bohl E.H., Kohler E.M., Saij L.J., Cross R.F., Agnes A.G. & Theil K.W. 1978. Rotavirus as a cause of diarrhoea in pigs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 172(4):458-465.
- Bohl E.H., 1979. Rotaviral diarrhoea in pigs. Brief review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 174(6):613-615.
- Carthier G. & Franz J. 1981. Detection of antirotavirus immunoglobulins A, G and M in swine colostrum, milk and feces by enzyme-linked immunosorbent assay. Infect. Immun. 31(2):833-836.
- Herring A.J., Inglis N.F., Ojeh C.K., Snodgrass D.R. & Menzies J.D. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. J. Clin. Microbiol. 16:473-477.
- Laemli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.
- Leece J.G., King M.W. & Mock R. 1976. Reovirus-like agent associated with fatal diarrhoea in neonatal pigs. Infect. Immun. 14:816-825.
- McNulty M.S., Pearson G.R. & McFerran J.B. 1976. A reovirus like agent (rotavirus) associated with diarrhoea in neonatal pigs. Vet. Microbiol. 1:55-63.
- McNulty M.S. 1978. Rotaviruses. J. Gen. Virol. 40:1-18.

- Pereira H.G., Azeredo R.S., Leite I.P.G., Andrade Z.P. & Castro L. 1985. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J. Virol. Methods* 10:21-28.
- Rodger S.M., Craven J.A. & Williams I. 1975. Demonstration of virus-like particles in intestinal contents of piglets with diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 51:536.
- Roehe P.M., Martins R.M., Bangel E.V. & Barcellos D.E.S.N. 1985. Ocorrência de rotavirus em granjas de suínos no Rio Grande do Sul. *Anais I Congresso Latino de Veterinários Especialistas em Suínos, Rio de Janeiro*, p. 123.
- San Juan C.S., Waace R.S., Scodeller E.A. & Bellinzoni R. 1985. Ocorrência de rotavirus em leitões com diarréia em rebanhos da região leste do Estado de São Paulo. *Hora Veterinária, Porto Alegre*, 28:40-45.
- San Juan C.S., Bellinzoni R.C., Mattion N., La Torre J. & Scodeller E.A. 1986. Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pig herds. *Res. Vet. Sci.* 41:270-272.
- Snodgrass D.R., Herring A.J., Campbell I., Inglis J.M. & Hargreaves F.D. 1984. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J. Gen.* 65 (5):909-914.
- Theil K.W., McCloskey C.M., Saif L.J., Redeman D.R., Bohl E.H., Hancock D.D., Kohler E.M. & Moorhead P.D. 1981. Rapid simple method for preparing rotaviral double-stranded ribonucleic acid for analysis by polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 14:273-280.
- Ueno H. & Gutierrez V.C. 1982. Manual de laboratório para o diagnóstico de helmintos em ruminantes. Univ. Autônoma de São Domingos. 112 p.
- Utrera V., Ilja R.M., Corziglia M. & Esparza J. 1984. Epidemiological aspects of porcine rotavirus infection in Venezuela. *Res. Vet. Sci.* 36:310-315.
- Woode G.N., Bridger J., Hall G.A., Jones J.M. & Jackson G. 1976. The isolation of reovirus-like agents (rotavirus) from acute gastroenteritis of piglets. *J. Med. Microbiol.* 9:203-209.
- Yolken R.H. & Leister F.J. 1981. Staphylococcal protein A-Enzyme immunoglobulin conjugates: versatile tools for enzyme immunoassays. *J. Immunol. Meth.* 43:209-218.