

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DIARREIA POR ROTAVÍRUS EM LEITÕES LACTENTES NO SUL DO BRASIL:
CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETECÇÃO
MOLECULAR

PAULA RODRIGUES DE ALMEIDA

PORTO ALEGRE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DIARREIA POR ROTAVÍRUS EM LEITÕES LACTENTES NO SUL DO BRASIL:
CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETECÇÃO
MOLECULAR

PAULA RODRIGUES DE ALMEIDA

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva e Patologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: David Driemeier

PORTO ALEGRE
2014

CIP - Catalogação na Publicação

Almeida, Paula Rodrigues de
Diarreia por rotavírus em leitões lactentes no sul
do Brasil: caracterização patológica e imuno-
histoquímica e detecção molecular / Paula Rodrigues de
Almeida. -- 2014.
66 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Rotavírus. 2. Diarreia em suínos lactentes. 3.
Imuno-histoquímica. 4. Atrofia de vilosidades. I.
Driemeier, David, orient. II. Título.

PAULA RODRIGUES DE ALMEIDA

DIARREIA POR ROTAVÍRUS EM LEITÕES LACTENTES NO SUL DO BRASIL:
CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETECÇÃO
MOLECULAR

Aprovado em 24/02/2014

APROVADO POR:

Prof. Dr. David Driemeier
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Laura Lopes de Almeida
Membro da Comissão

Prof. Dr. David Emilio Santos Neves de Barcellos
Membro da Comissão

Prof. Dr. Saulo Pettinati Pavarini
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas e oportunidades maravilhosas ao longo do período da minha graduação.

Agradeço aos meus pais por serem os melhores exemplos que eu poderia seguir, por terem um amor e uma paciência infinitos e por sempre me apoiarem, à Fer, ao Rafa e à Talita pela paciência e compreensão nos momentos estressantes do mestrado e por sempre elevarem exageradamente minha auto-estima.

Agradeço aos Dindos Daniel e Arnildo, Dindas Rosi e Jane e primos Gão, Nanda e Dani por sempre me apoiarem, por ouvirem os ensaios deste e de muitos outros trabalhos, por corrigirem minhas referências (Dani!).

Agradeço aos meus avós, pelo exemplo que são e por sempre acreditarem em mim.

Agradeço aos professores, especialmente ao Prof. David, e a todos os colegas e amigos do Setor de Patologia Veterinária e do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada, pelos anos de orientação, amizade e qualificação na minha formação.

Agradeço ao Professor Albert pela amizade, pelos inúmeros ensinamentos, pelo apoio e vontade de ensinar e por ter me inspirado a fazer este trabalho.

Agradeço aos Médicos Veterinários que atuam na clínica de suínos, que nos forneceram informações, nos chamaram para as saídas de campo e confiaram no nosso trabalho.

Agradeço à equipe do Setor de Virologia da UEL por ter aceitado fazer este trabalho em parceria.

RESUMO

DIARREIA POR ROTAVÍRUS EM LEITÕES LACTENTES NO SUL DO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E IMUNO-HISTOQUÍMICA E DETECÇÃO MOLECULAR

Rotavírus (RV) é um importante patógeno viral que causa diarreia em leitões e indivíduos jovens de várias outras espécies animais. RV dos grupos A, B, C e E foram descritos como causa de diarreia em suínos. Este estudo reúne achados histopatológicos, imuno-histoquímicos e de reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) presentes em quatro surtos de diarreia causados por RV de um e de múltiplos grupos na região sul do Brasil. Vacinação para RV não era aplicada em nenhuma das granjas estudadas. Necropsia, exames histológicos e imuno-histoquímicos foram realizados em 34 suínos de maternidade que apresentavam diarreia severa, além disso, realizou-se cultivo bacteriano e RT-PCR para RV dos grupos A, B e C, vírus da gastroenterite transmissível (TGEV), vírus da diarreia epidêmica dos suínos (PEDV), sapovírus (SaV), norovírus (NoV) e kobuvírus (Aichi vírus C) em 30 dessas amostras. Desidratação e conteúdo pastoso a líquido no cólon foram observados em todos os suínos. Exame histológico revelou atrofia de vilosidades em 29 casos, vacuolização de enterócitos em 27 casos e debris celulares na lâmina própria em 20 casos. Houve marcação imuno-histoquímica positiva em 21 casos. RT-PCR foi positiva para RV em 20 casos e RV do grupo C foi o mais frequentemente detectado, presente em 17 amostras. Cultivo e isolamento de *Escherichia coli* ocorreu em todos os casos e quatro destes foram de *E. coli* α -hemolítica. Em 15 amostras houve isolamento de *Clostridium* sp. Sapovirus foi detectado em oito amostras, duas amostras foram positivas para norovírus e detectou-se kobuvírus em 11 animais. Os achados histológicos foram consistentes com infecção por RV e a imuno-histoquímica revelou dois padrões de marcação para o agente no intestino delgado. Os resultados de RT-PCR mostraram que o RV do grupo C foi o principal agente detectado neste estudo. O isolamento de *E. coli* e a detecção de SaV os destacou como agentes associados à infecção por RV. A detecção de kobuvírus o enfatiza como um novo candidato em associação com RV.

Palavras chave: suínos, diarreia, imuno-histoquímica, rotavírus, atrofia de vilosidades.

ABSTRACT

ROTAVIRUS DIARRHEA IN SUCKLING PIGLETS FROM THE SOUTH OF BRAZIL: PATHOLOGIC AND IMMUNOHISTOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND MOLECULAR DETECTION.

Rotavirus is an important viral pathogen causing diarrhea in piglets and other animal species worldwide. Groups A, B, C and E have been described causing diarrhea in swine. This study reunites histopathological, immunohistochemical and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) findings present in four outbreaks of diarrhea caused by single and multiple groups of rotavirus in the south of Brazil. None of the herds studied applied vaccination against rotavirus. Necropsy, histological examination and immunohistochemistry were performed in 34 nursing piglets that presented severe diarrhea, bacterial culture and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for rotavirus from groups A, B and C, transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), sapovirus (SaV), norovirus (NoV) and kobuvirus (Aichi virus C) were carried out in 30 of the animals necropsied. Additionally, RT-PCR was performed in fecal pools from two outbreaks. Dehydration and fluid to pasty contents were observed in the colon of all 34 swine examined. Histological examination revealed villus atrophy in 29 cases, vacuolation of enterocytes in 27 cases and necrotic debris in the *lamina propria* of 20 cases. IHC was positive in 21 samples. RT-PCR was positive for rotavirus in 20 samples and group C rotavirus was the most frequently detected, present in 17 samples. *Escherichia coli* was isolated from all cases, and in four cases, it was α -hemolytic. *Clostridium* sp. was isolated from 15 samples. Sapovirus was detected in eight samples, samples from two animals were positive for norovirus and kobuvirus was detected from 11 samples. Histological findings were consistent with rotavirus infection and immunohistochemistry revealed two patterns of staining for rotavirus in the small intestine. RT-PCR results have shown group C rotavirus as the main agent detected in this study. The isolation of *Escherichia coli* and the detection of sapovirus highlighted them as possible agents associated to rotavirus infection. Kobuvirus detection has emphasized it as a new candidate in the association with rotavirus.

Keywords: swine, diarrhea, immunohistochemistry, rotavirus, villus atrophy.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Etiologia	10
2.2 Epidemiologia.....	12
2.3 Patogenia.....	13
2.4 Sinais clínicos.....	15
2.5 Achados de necropsia e histológicos	15
2.6 Diagnóstico.....	16
3. ARTIGO	19
4. DISCUSSÃO GERAL	48
5. FIGURAS ADICIONAIS.....	54
6. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

O RV é um agente cosmopolita que causa diarreia em indivíduos de diversas espécies animais (SAIF, 2011). A diarreia está entre os problemas mais prevalentes na suinocultura e está entre as maiores causas de redução no ganho de peso (JOHANSEN *et al.*, 2004). Doenças entéricas na suinocultura causam perdas econômicas estimadas em 5,5 milhões de libras esterlinas no Reino Unido, decorrentes da perda de peso, mortalidade, tratamento e controle (BENNET & IJPELAAR, 2005). Dentre os patógenos virais, o RV é uma das causas de diarreia mais frequentes em leitões de maternidade (WIELER *et al.*, 2001; KATSUDA *et al.*, 2006; HALAIHEL *et al.*, 2010).

Suínos que não tiveram contato com antígenos de RV são mais suscetíveis à infecção até 12 semanas após o nascimento (GELBERG, 1992), com uma menor frequência nos primeiros dias de vida, que aumenta entre a segunda e a terceira semanas. O RV é o agente mais prevalente em leitões entre três e seis semanas de idade, com uma diminuição na prevalência até oito semanas de vida (WILL *et al.*, 1994). O vírus tem tropismo por enterócitos maduros (LOPEZ & ARIAS, 2004) e suínos neonatos apresentam baixa taxa de reposição de enterócitos. Este fato contribui para que enterócitos maduros suscetíveis, bem como enterócitos infectados permaneçam por mais tempo no intestino tornando os animais mais jovens altamente suscetíveis à infecção por RV (GELBERG, 1992).

Quando não associada a outros patógenos, como TGEV, coccídios ou *Escherichia coli*, a infecção por RV apresenta baixa morbidade e mortalidade (WILL *et al.*, 1994). Isolamento de *E. coli* pode ocorrer em casos de infecção por RV, embora ela possa também ser comensal (WILL *et al.*, 1994).

Sinais clínicos associados a infecção por RV são observados de 19 a 24 horas após a infecção e são caracterizados por anorexia, vômito, depressão e diarreia que pode persistir por 10 dias com perda de até 15% do peso corporal (CROUCH & WOODE, 1978).

O RV é membro da família *Reoviridae*, seu genoma tem 11 fragmentos de RNA em fita dupla codificando 12 proteínas, seis estruturais (VP1-4, VP6 e VP7) e seis não-estruturais (NSP1-6) (SAIF, 2011). O capsídeo é organizado em três camadas de proteínas estruturais (VP), a camada interna é composta pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, a camada intermediária pela VP6 e a camada mais externa pelas proteínas VP4 e VP7. A VP4 é

dividida em VP5 e VP8 após clivagem pela tripsina (LOPEZ & ARIAS, 2004; SETTEMBRE *et al.*, 2011). O RV é dividido em sete grupos classificados de A a G com base no sequenciamento da proteína estrutural 6 (VP6) (PEDLEY *et al.*, 1983; SNODGRASS *et al.*, 1984; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2012).

RV dos grupos A, B, C e E causam diarreia em suínos (SAIF, 2011; WAKUDA *et al.*, 2011). Além desses, é proposto também o RV do grupo H, causador de diarreia em suínos e humanos (ALAM *et al.*, 2007; WAKUDA *et al.*, 2011). RV pertencentes ao grupo A são os mais comumente detectados em humanos e suínos (SAIF, 2011), contudo, a prevalência de RV do grupo C tem aumentado recentemente, (MARTELLA *et al.*, 2007; MEDICI *et al.*, 2011; AMIMO *et al.*, 2013).

Macroscopicamente, o RV causa emagrecimento, desidratação, distensão das alças intestinais com gás e conteúdo pastoso a líquido no cólon e no ceco (CROUCH & WOODE, 1978). As lesões histológicas observadas em suínos afetados incluem redução no comprimento de vilosidades, perda e fusão de vilosidades, células epiteliais cuboidais a pavimentosas na extremidade das vilosidades e descamação epitelial no intestino delgado (CROUCH & WOODE, 1978). Em camundongos também é observada acentuada vacuolização epitelial na extremidade das vilosidades (CIARLET *et al.*, 2002).

O primeiro método de diagnóstico utilizado para detecção de RV foi a microscopia eletrônica (MCNULTY, 1978), subsequentemente, a técnica de PAGE foi desenvolvida permitindo a classificação do vírus em grupos (HERRING *et al.*, 1982). Atualmente, essas técnicas continuam sendo aplicadas para diagnóstico de RV (RODAK *et al.*, 2011). Contudo, diversas outras técnicas capazes de detectar e diferenciar grupos de RV são utilizadas hoje em dia, baseadas em detecção de anticorpos, de antígenos e de genoma viral por reação em cadeia da polimerase seguida de transcriptase reversa (RT-PCR) (GOUVEA *et al.*, 1990; GENTSCH *et al.*, 1992; GOUVEA *et al.*, 1994a; GOUVEA *et al.*, 1994b; ALFIERI *et al.*, 1999a; LOGAN *et al.*, 2006; THONGPRACHUM *et al.*, 2010; YASMON *et al.*, 2010; LORENZETTI *et al.*, 2011). Devido à sua alta sensibilidade e praticidade, RT-PCR é o método de escolha para diagnóstico de RV (CLARK & MCKENDRICK, 2004; ROVIDA *et al.*, 2013).

A grande vantagem da imuno-histoquímica (IHQ) no diagnóstico de infecção por RV, é que ela permite a detecção do antígeno no tecido afetado, relacionando o agente causador com a lesão histológica. A IHQ positiva para RV marca grânulos no citoplasma de enterócitos (GELBERG, 1992). Entre 31 e 48 horas pós-infecção, observa-se maior positividade na marcação (GELBERG, 1992). A marcação é mais intensa em porções

mediais e distais do intestino delgado, embora marcação em enterócitos no duodeno, ceco e cólon também seja possível (GELBERG 1992).

O objetivo deste trabalho foi descrever surtos de diarreia causados por RV envolvendo grupos A, B e C em leitões de maternidade no sul do Brasil incluindo achados macroscópicos, histológicos, imuno-histoquímicos, isolamento bacteriano e detecção de genoma viral de vírus entéricos por RT-PCR.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiologia

O RV pertence à família *Reoviridae*, seu genoma está contido em 11 segmentos de RNA em fita dupla (SAIF, 2011). O material genético é envolto por três camadas concêntricas de proteínas estruturais (PESAVENTO *et al.*, 2006; SAIF, 2011). A camada mais interna é composta pela proteína estrutural VP2, enquanto as proteínas VP3 e VP1, envolvidos na replicação viral e expressão de proteínas, formam complexos dentro desta camada que ficam circundados pelo RNA viral. A camada intermediária é formada pela VP6, organizada em trímeros, formando uma estrutura icosaédrica em contato direto com a VP7 na camada externa e com a VP2 na camada interna. A camada externa é formada pelas proteínas VP7 e VP4. A VP7 forma a maior parte da superfície externa da partícula viral, organizada em trímeros contendo canais aquosos que passam através dela e da próxima camada. Dímeros da proteína estrutural VP4 formam 60 espículas na camada externa do vírus (PESAVENTO *et al.*, 2006). Após a entrada do vírus no hospedeiro, a VP4 presente nessas espículas é dividida em VP5 e VP8, e o vírus se torna hábil a entrar na célula hospedeira (LOPES & ARIAS, 2004).

Entre as proteínas não-estruturais do RV cuja função está bem estabelecida, há a NSP1, NSP2, a NSP3 e a NSP5. A NSP3 auxilia na tradução do mRNA em proteínas virais por mecanismos da célula hospedeira. Por outro lado, a NSP2 e a NSP5 formam os viroplasmatas, inclusões eletro-densas, sem membrana, localizadas adjacentes ao núcleo da célula hospedeira, onde ocorrem a replicação viral e a formação da partícula viral com suas duas primeiras camadas (PESAVENTO *et al.*, 2006). A NSP1 não tem função na replicação do vírus, porém participa da modulação da resposta celular do hospedeiro, inibindo a síntese de interferon, conseqüentemente aumentando a patogenicidade do vírus (GRAFF *et al.*, 2002). A NSP4 tem algumas funções estabelecidas, ela age como proteína

transmembrana do retículo endoplasmático rugoso e induz a liberação de água nos enterócitos, atuando de forma semelhante a toxinas presentes em bactérias como a *Escherichia coli* (enterotoxinas termolábil e termorresistente) e a *Vibrio cholerae* (toxina da cólera) (PESAVENTO, 2006; LORROT & VASSEUR, 2007). A NSP6 é uma proteína pequena, cuja função não foi estabelecida e não é fundamental para patogenicidade ou replicação viral, já que há estirpes de RV em que ela não está presente (TORRES-VEGA *et al.*, 2000).

O RV possui ampla variabilidade genética e antigênica, sendo dividido em 7 grupos, classificados de A a G, de acordo com o padrão de migração dos fragmentos de RNA através de eletroforese em gel de poliacrilamida e com o sequenciamento do gene que codifica a proteína VP6 (PEDLEY *et al.*, 1983; SNODGRASS *et al.*, 1984; MATTHIJNSSENS *et al.*, 2012). Esta proteína ainda permite a classificação do RV do grupo A em subgrupos I, II, I+II e não (I+II) (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008). O RV do grupo A pode ser classificado também de acordo com outras 2 proteínas altamente antigênicas, a VP4 e a VP7. A classificação genotípica conforme a VP4 (P), proteína sensível à protease, possibilita no mínimo 27 tipos e é precedida pela letra P. A VP7 (G), que é uma proteína glicosilada e por isso utiliza-se a letra G na sua classificação, está subdividida em pelo menos 19 genótipos. Além dessas, hoje em dia é proposto que incluam-se todas as proteínas virais na classificação de cada vírus detectado e sequenciado, o que valoriza a informação contida para estudos genéticos e de mutações (MATTHIJNSSENS *et al.*, 2008).

RV do grupo B são menos estudados que os do grupo A, portanto poucas subclassificações são sugeridas para este grupo. A VP7 é a proteína melhor caracterizada em RV do grupo B, por isso é comumente utilizada para comparação de exemplares de RV do grupo B (KOBAYASHI *et al.*, 2001). Há uma diversidade genética maior entre proteínas VP7 de RV do grupo B do que em RV dos grupos A e C (KUGA *et al.*, 2009).

Assim como em RV do grupo B, há menos informações disponíveis sobre RV do grupo C do que do grupo A. Diferenciação entre estirpes de RV do grupo C pode ser realizada através de RT-PCR dos genes que codificam as proteínas VP7 (ALFIERI *et al.*, 1999a), VP6 (MEDICI *et al.*, 2010) e VP4 (AMIMO *et al.*, 2013). A classificação desse grupo de RV se baseia em filogenia genética após o sequenciamento (ALFIERI *et al.*, 1999a; MEDICI *et al.*, 2010).

RV dos grupos A, B, C e E causam diarreia em suínos (SAIF, 2011; WAKUDA *et al.*, 2011). RV do grupo A é o mais frequentemente isolado de humanos e suínos (SAIF,

2011), entretanto, recentemente a prevalência de RV do grupo C tem aumentado em suínos (MARTELLA *et al.*, 2007; MEDICI *et al.*, 2011; AMIMO *et al.*, 2013).

2.2 Epidemiologia

RV pode resistir na água por longos períodos, portanto infecções podem ocorrer a partir de água contaminada (SAIF, 2011), em fezes mantidas a 10° C, o RV pode permanecer estável e patogênico por 32 meses (RAMOS *et al.*, 2000). Além disso muitas estirpes são altamente resistentes à maioria dos desinfetantes baseados em quaternário de amônio, detergentes aniônicos ou catiônicos, álcool etílico a 70% e a 95%, álcool isopropílico a 70% e ao cloro. Entre as soluções desinfetantes capazes de eliminar RV estão o glutaraldeído a 2%, iodo-povidona com 1% de iodo disponível e à amônia quaternária combinado com álcool a 40% ou ácido clorídrico (LLOYD-EVANS *et al.*, 1986).

RV tem distribuição mundial e já foi detectado em surtos de diarreia com sinais clínicos e epidemiologia semelhantes em diversas espécies animais (SAIF, 2011). No Japão, o RV foi o enteropatógeno mais prevalente em um estudo envolvendo suínos de até 3 semanas e com 3 a 7 semanas de idade, com 67,3% e 65,5% de prevalência, respectivamente. Nesse estudo também constatou-se alta percentagem de animais com menos de uma semana infectados por RV (KATSUDA *et al.*, 2006). Um estudo epidemiológico realizado a partir de amostras de diarreia enviadas para diagnóstico, observou-se uma percentagem de detecção de RV de aproximadamente 40% na primeira semana de vida, com um segundo aumento entre a terceira e a sexta semanas de vida, com uma percentagem maior de diarreias por RV do que por qualquer outro agente nesse período (WILL *et al.*, 1994). Na Espanha, a prevalência de RV em suínos com menos de oito semanas chegou a 73,7%, decrescendo acentuadamente após essa idade (HALAIHEL *et al.*, 2010). Por outro lado, em um estudo de prevalência de enteropatógenos virais no sul da Alemanha, o RV teve uma prevalência de 32,3%, menor do que outros enteropatógenos, dado observado por outros autores nesse país. Ainda assim, como em outros estudos, foi constatada a tendência de maior prevalência do agente entre a terceira e a quarta semanas de vida (WIELER *et al.*, 2001).

Em um estudo longitudinal da rotavirose em suínos conduzido no Brasil, também observou-se maior frequência de detecção de RV em animais em período de desmame (quatro semanas de vida), diminuindo até a oitava semana (ALFIERI *et al.*, 1999b).

Prevalência de 39,29% de RV em leitões neonatos foi demonstrada em um estudo de caso-controle recente no Brasil (LIPPKE *et al.*, 2011). Outro estudo conduzido em rebanhos brasileiros, no qual foram testadas fezes de leitões com quadro de diarreia em 10 municípios de São Paulo, o RV apresentou uma frequência de 29,86% (GREGORI *et al.*, 2009). Um estudo mais recente envolvendo diarreia em leitões lactentes no Brasil evidenciou o rotavírus como um dos principais agentes causadores de diarreia em leitões de até sete dias de vida, com uma frequência de detecção de 13% (CRUZ-JUNIOR *et al.* 2013)

Entre os principais fatores de risco para diarreia por RV relacionados ao manejo de suínos estão desmame com menos de 28 dias, rebanhos maiores, e vacinação de fêmeas antes do parto. A imunidade passiva é fundamental na prevenção de infecção por RV em leitões neonatos e diminui a severidade e duração da diarreia e o período de excreção de vírus pelos leitões (HODGINS *et al.*, 1999; DEWEY *et al.*, 2003).

A proporção de leitões excretando vírus é crescente na maternidade do nascimento ao desmame (GELBERG *et al.*, 1991). Em infecções naturais, RV é excretado em maiores títulos em diarreia do que em fezes normais, podendo ter títulos cinco vezes maior em amostras de fezes diarreicas (GATTI *et al.*, 1993; HALAIHEL *et al.*, 2010).

2.3 Patogenia

RV tem tropismo por enterócitos maduros e sua entrada nas células entéricas pode ocorrer de duas formas: a primeira ocorre em animais muito jovens, com até 2 dias de vida, através da absorção entérica de macromoléculas (GELBERG, 1992); a segunda depende da clivagem da proteína VP4 pela tripsina do hospedeiro, resultando na sua divisão em VP5 e VP8 e tornando a partícula viral infectante (LOPEZ & ARIAS, 2004). Integrinas da superfície celular, que geralmente agem na interação com matriz celular e adesão, estão envolvidas na ligação do vírus com a célula do hospedeiro. Em algumas cepas de RV, conhecidas como neuraminidase-sensíveis, ocorre a ligação da VP8 com receptores de ácido siálico (CIARLET & ESTES, 1999; LOPEZ & ARIAS, 2004). Depois disso, o domínio VP5 da proteína VP4 interage com a integrina $\alpha 2\beta 1$ e subsequentemente com a proteína sensível ao calor Hsc70, aproximando mais o vírus da célula e, finalmente, a proteína VP7 entra em ação, ligando-se às integrinas $\alpha v\beta 3$ e $\alpha x\beta 2$ (LOPEZ & ARIAS, 2004).

Após a entrada na célula, forma-se viroplasmas de RV, estruturas eletrodensas onde ocorre a replicação viral, que se unem e migram para a região perinuclear da célula (EICHWALD *et al.*, 2012). A entrada de RV na célula afeta o co-transporte de solutos orgânicos por íons Na^+ através da inibição de dissacaridases pela NSP4 (HALAIHEL *et al.*, 2000; LORROT & VASSEUR, 2007). O acúmulo de dissacarídeos no lúmen intestinal causa um acúmulo osmótico de água no lúmen, que configura o componente osmótico da diarreia por RV. Além disso, a NSP4 induz secreção excessiva de Cl^- por canais de $\text{Cl}^- \text{Ca}^+$ dependentes e rompe as junções celulares (*tight junctions*), resultando em permeabilidade paracelular (RAMIG, 2004; LORROT & VASSEUR, 2007). Há ainda ativação do sistema nervoso entérico em infecções por RV (RAMIG, 2004; KORDASTI *et al.*, 2006), porém os mecanismos envolvidos nessa ativação não estão elucidados (LORROT & VASSEUR, 2007).

Através da imunofluorescência é possível observar a presença de antígenos virais no intestino infectado por RV. O momento em que há maior concentração de vírus é de 19 a 22h após a infecção, ela diminui em um período de 24h e se mantém estável nas 48h seguintes. Há um leve aumento na concentração de RV do intestino após 60h de infecção e após cinco dias os vírus desaparecem por completo. No início da infecção, as células positivas estão descamadas na superfície das vilosidades e após o início da recuperação, antígenos virais são encontrados nas células do ápice das vilosidades. Essa marcação pode ser explicada pela ascensão de células recuperadas a partir das criptas, além disso, também explica o segundo pico de replicação que ocorre após 60 a 65 horas após a infecção (CROUCH & WOODE, 1978). A recuperação inicial da infecção por RV se deve principalmente à menor disponibilidade de receptores nos enterócitos imaturos que emergem das criptas e à síntese de substâncias protetoras para as células como o interferon (WELCH & TWIENHAUS, 1973; HOLMES *et al.*, 1976).

As porções iniciais do intestino delgado são menos afetadas pela infecção por RV, já que há diversidade na diferenciação celular em locais distintos do intestino delgado. A mortalidade menor na infecção por RV quando comparada a TGE pode ser explicada pela disseminação das lesões ser mais lenta, dando tempo ao intestino para a recuperação das lesões (CROUCH & WOODE, 1978).

Fêmeas excretam RV no período puerperal (BENFIELD *et al.*, 1982, SAIF & FERNANDEZ 1996) e leitões jovens são mais suscetíveis a infecção, devido à capacidade de absorver macromoléculas, facilitando a entrada de vírus nas células e à baixa taxa de reposição de enterócitos que confere recuperação mais lenta. Portanto, altas

concentrações de antígeno viral são observadas em enterócitos de intestinos de suínos neonatos infectados por RV (GELBERG, 1992).

2.4 Sinais clínicos

Diarreia, inapetência severa e perda da condição corporal são evidentes 16h pós inoculação com RV em suínos gnotobióticos com seis dias de idade. A diarreia diminui nas 44 horas que seguem a inoculação, porém a inapetência continua e a condição corporal não é recuperada (HALL *et al.*, 1976). Algumas vezes há vômito e a diarreia permanece severa por até 78h (GRAHAM *et al.*, 1984). O curso da doença varia de 4 a 8 dias, podendo evoluir para cura ou para morte quando há infecção bacteriana associada MCNULTY *et al.*, 1978).

2.5 Achados de necropsia e histológicos

Suínos infectados por RV apresentam alças intestinais dilatadas com gás, conteúdo flácido ou fluido no ceco e no cólon espiral, estado corporal pobre e desidratação (HALL *et al.*, 1976; GELBERG, 1992).

As principais lesões histológicas observadas no intestino delgado de suínos consistem em diminuição da relação comprimento de vilosidades e profundidade de cripta (V:C), que ocorrem principalmente em porções médias e distais do intestino delgado e em menor proporção no duodeno (CROUCH & WOODE, 1978). Essas lesões, que se estabelecem 36h após a infecção, com a alteração na proporção V:C, que passa de >10:1 para 4:1. Há ainda perda das microvilosidades e algumas vezes de epitélio no ápice das vilosidades. As células que as substituem durante a regeneração epitelial, são pavimentosas a cuboidais, e sua funcionalidade não é equivalente a de células maduras, resultando em prolongamento de sinais de diarreia mesmo após a eliminação completa do vírus (CROUCH & WOODE, 1978).

Assim, as vilosidades diminuem em tamanho, número e por vezes se encontram fusionadas e seu epitélio passa a variar entre cubóide e pavimentoso e células descamadas são observadas na luz intestinal. Em 65 a 90 horas pós-infecção há recuperação do epitélio, embora as vilosidades permaneçam atrofiadas (CROUCH & WOODE, 1978).

A proporção V:C permanece alterada em suínos que passaram por infecção por RV por pelo menos três semanas e será menor que em animais não infectados (CROUCH & WOODE, 1978).

Entre os achados histológicos menos comuns nas infecções por RV estão a vacuolização de enterócitos, mais frequentemente relatada em camundongos (CIARLET *et al.*, 2002; KORDASTI *et al.*, 2006), porém também observada em suínos (GELBERG *et al.*, 1990) e a presença de células sinciciais, relatada em infecção por RV dos grupos A e B (GELBERG *et al.*, 1990, SALIM *et al.*, 1995).

2.6 Diagnóstico

O cultivo de RV é fundamental para a pesquisa envolvendo a biologia do RV, sua patogenicidade e para o desenvolvimento de vacinas (SATO *et al.*, 1981; BOHL *et al.*, 1994). Apesar disso, é uma técnica laboriosa devido à natureza fastidiosa do RV, ademais, RV dos grupos B e C são ainda mais difíceis de cultivar e por isso esse método é raramente usado para diagnóstico (SANEKATA *et al.*, 1996; CUCKOR & BLACKLOW, 1984).

RV foi descoberto através da microscopia eletrônica (ME) em fezes de bovinos, posteriormente, essa técnica permitiu a visualização do agente em fezes de crianças com diarreia aguda (MCNULTY, 1978). A ME ainda é utilizada em pesquisa, para detecção rápida de RV, como contraprova na detecção de RV por outras técnicas, bem como para detectar e diferenciar outros vírus capazes de causar infecções gastrointestinais (GOUVEA *et al.*, 1991; GOLDSMITH & MILLER, 2009; RODÁK *et al.*, 2011; MARSHALL, 2012). Entretanto, a necessidade de técnicas menos onerosas permitiu o surgimento de métodos de detecção de antígenos e sorologia (MCNULTY, 1978).

A técnica de diagnóstico através de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) permitiu a classificação de RV em grupos distintos através do padrão de migração do genoma viral. Entre os grupos A, B e C de RV há diferença marcante entre os segmentos 7 e 9, com uma formação chamada de *triplet* entre esses segmentos no grupo A. por outro lado, o padrão de migração dos pertencentes aos grupos vírus D e E apresenta os fragmentos de RNA uniformemente distribuídos em PAGE e o RV do grupo D possui 5, e não 4, fragmentos na zona de alto peso molecular (PEDLEY *et al.*, 1983; HERRING *et al.*, 1982).

Diagnóstico de RV através de ensaio imuno-enzimático (ELISA) é frequentemente realizado pela alta sensibilidade e praticidade que a técnica oferece (DENNEHY *et al.*, 1990; RODÁK *et al.*, 2011). Anticorpos monoclonais foram desenvolvidos para classificar RV's humanos através dessa técnica (SHAW *et al.*, 1985; COULSON *et al.*, 1987; AHMED *et al.*, 1989).

Atualmente são utilizadas várias técnicas baseadas em RT-PCR que detectam e diferenciam grupos e genótipos de RV (GOUVEA *et al.*, 1990; GOUVEA *et al.*, 1991; GENTSCH *et al.*, 1992; GOUVEA *et al.*, 1994a, GOUVEA *et al.*, 1994b, ALFIERI, *et al.*, 1999a; LOGAN *et al.*, 2006; THONGPRACHUM *et al.*, 2010; YASMON *et al.*, 2010; LORENZETTI *et al.*, 2011). Embora técnicas clássicas de diagnóstico de RV ainda sejam empregadas atualmente (RODAK *et al.*, 2011), RT-PCR é considerado o método de escolha para o diagnóstico de RV devido ao alto grau de sensibilidade e especificidade oferecido e também devido à sua praticidade (CLARK & MCKENDRICK, 2004; ROVIDA *et al.*, 2013).

A grande vantagem da imuno-histoquímica (IHQ) no diagnóstico de infecção por RV é que ela permite associação agente com lesão, já que as técnicas de detecção de RV descritas anteriormente podem ser positivas em fezes normais. A IHQ positiva para RV é observada na forma de grânulos no citoplasma de enterócitos (GELBERG *et al.*, 1990; GELBERG, 1992). A marcação é mais intensa em porções mediais e distais do intestino delgado, embora possa haver enterócitos positivos no duodeno, ceco e cólon (GELBERG, 1992).

2.7 Diagnóstico diferencial

Os achados histológicos, bem como os sinais clínicos apresentados na infecção por rotavírus podem estar presentes em outras viroses intestinais que afetam suínos e em infecção por *Isospora suis*. O diagnóstico de *I. suis* pode ser realizado através da visualização em cortes histológicos ou por teste de flutuação aplicado em amostras fecais (KATSUDA *et al.*, 2006; CRUZ-JUNIOR *et al.*, 2013).

Entre essas viroses está a infecção por vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (em inglês, TGE) e pelo vírus da diarreia epidêmica dos suínos (em inglês, PED), ambos coronavírus que afetam especificamente suínos. A TGE pode ocorrer em leitões com menos de 3 semanas de idade e também leva a atrofia de vilosidades. A PED é semelhante à TGE (BROWN *et al.*, 2006). O diagnóstico desses agentes é realizado principalmente por RT-PCR (KIM *et al.*, 2001; KWEON *et al.*, 1997).

Atualmente outros vírus estão sendo relacionados com atrofia de vilosidades afetando suínos. Membros da família *Caliciviridae* como o sapovírus e o norovírus estão entre esses agentes. O norovírus causa atrofia de vilosidades moderada, atenuação epitelial e edema no duodeno de suínos (CHEETHAM *et al.*, 2006), enquanto o sapovírus

causa atenuação epitelial e vacuolização epitelial em duodeno, jejuno e íleo (GUO *et al.*, 2006). O diagnóstico desses vírus é realizado através de RT-PCR (JIANG *et al.*, 2006).

Além desses, há ainda o kobuvírus, pertencente à família *Picornaviridae* e recentemente relacionado a diarreias em suínos, especialmente em leitões de maternidade (BARRY *et al.*, 2008). Contudo, até o presente momento não há associação da detecção do material genético deste vírus com lesões macroscópicas ou histológicas (REUTER *et al.*, 2011).

2.8 Prevenção e controle

Algumas práticas de manejo aumentam a frequência de detecção de RV em casos de diarreia. O desmame em animais mais jovens está relacionado com maior frequência de detecção de RV. Criação de suínos em múltiplas localidades também apresentava maior detecção de RV em fezes diarreicas de leitões do que em granjas de ciclo completo. Rebanhos maiores também apresentam maior incidência de infecção por RV, principalmente devido à variação no nível de imunidade das fêmeas (DEWEY *et al.*, 2003). Além disso, a vacinação de fêmeas para RV é uma prática que previne surtos de rotavirose nos suínos, já que leitões que ingerem colostro de fêmeas imunizadas contra RV tem menos chances de adquirir infecção por RV (HODGINS *et al.*, 1999).

3. ARTIGO

Neste item é apresentado o artigo intitulado “Diarrhea caused by rotavirus in suckling piglets from the south of Brazil: pathologic and immunohistochemical characterization and molecular detection”, que foi redigido segundo as normas do periódico *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*.

**Diarrhea caused by rotavirus in suckling piglets from the south of Brazil:
pathologic and immunohistochemical characterization and molecular detection.**

Paula R Almeida, Elis Lorenzetti, Raquel A Sales, Tatiane TN Watanabe, Priscila
Zlotowski, Amauri A Alfieri e David Driemeier

From the Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Almeida, Sales, Watanabe, Zlotowski and Driemeier), and Setor de Virologia, Universidade estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil (Lorenzetti and Alfieri).

Corresponding author: David Driemeier, Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: davetpat@ufrgs.br.

Short running title: Rotavirus diarrhea outbreaks in the South of Brazil.

Abstract. Rotavirus (RV) is an important viral pathogen causing diarrhea in piglets and other mammals worldwide. This paper describes 4 outbreaks of diarrhea caused by single and multiple groups of RV in the south of Brazil from 2011 to 2013. None of the herds studied used vaccination against RV. Necropsy, histological examination and immunohistochemistry were performed in 34 suckling piglets that presented severe diarrhea. Aerobic and anaerobic bacterial culture and RT-PCR for RV from groups A, B and C, transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), sapovirus (SaV), norovirus (NoV) and kobuvirus (Aichi virus C) were carried out in 30 of the animals necropsied. Additionally, RT-PCR was performed in fecal pools from 2 outbreaks. Fluid to pasty contents were observed in the colon of all 34 animals examined. Histological examination revealed villus atrophy in 29 cases, vacuolation of enterocytes in 27 cases and cell debris in the *lamina propria* of 20 cases. IHC was positive in 21 samples. RT-PCR was positive for RV in 20 samples and group C RV was the most frequently detected, present in 17 samples. *Escherichia coli* was isolated from all cases, and in 4 cases, it was α -hemolytic. *Clostridium* sp. was isolated from 15 samples. Sapovirus was detected in 8 samples, samples from 2 animals were positive for norovirus and kobuvirus was detected from 11 samples.

Keywords: Diarrhea; immunohistochemistry; rotavirus; swine.

Introduction

In the swine industry, diarrhea is among the most prevalent problems, causing economic losses related to deaths and reduced weight gain. Among viral pathogens, RV is one of the most frequent cause of diarrhea in suckling piglets.^{15, 29}

Swine naive to RV are more susceptible to viral infection until 12 weeks after birth, due to their slower enterocyte turnover rate,¹⁸ with a higher incidence of RV infection between 3 days and 6 weeks of age.⁵⁴ Usually, clinical signs are observed 19 to 24 hours post infection and are characterized by anorexia, vomiting, apathy and profuse diarrhea that can persist through 10 days causing up to 15% weight loss.¹⁴

RV is a member of the *Reoviridae* family, its genome has 11 double-stranded RNA fragments. The virus is divided into 7 groups classified from A to G based on viral protein 6 (VP6) gene sequencing.^{39, 49} Groups A, B, C and E cause diarrhea in swine.^{47, 53} Group A RV is the most commonly RV group isolated from humans and swine,⁴⁷ however, group C RV prevalence in swine has increased recently.^{3, 38, 40} It has also been proposed a novel RV belonging to group H that causes diarrhea in pigs and humans.^{1, 53}

Grossly, RV causes emaciation, gas distended intestinal bowels and liquid to pasty contents in spiral colon and cecum.¹⁴ RV has tropism for mature enterocytes.³⁶ Histological lesions observed in swine infected are reduction in the villus length: crypt length ratio, villus loss and fusion, cuboidal to flat epithelial cells on the tip of the villi and epithelial desquamation in the small intestine.¹⁴ In mice, it has been observed severe epithelial vacuolation in the tip of the villi.¹¹

There are several methods of diagnosis for RV. Electron microscopy is a rapid method to diagnose RV presence in feces, and polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) is used to differentiate between groups of RV²³. Nowadays, RT-PCR is the method of choice for RV diagnosis, since it presents a high sensitivity and the different protocols of

this technique available in the literature allow differentiation between rotaviral strains making it a convenient technique.^{12, 46} Immunohistochemistry (IHC) can be used for RV infection diagnosis, and has the advantage of association of the agent with histological lesion, making it a highly specific technique. RV positive IHC stains granules in the cytoplasm of enterocytes and there is a positive staining peak between 31 and 48 hours post infection.¹⁸ The staining is more intense in distal and medial portions of the small intestine, although there can be positive enterocytes in the duodenum, cecum and colon, without difference related to age of the animals.¹⁸ The disadvantage of this technique is that for an agent with a high diversity such as RV, it requires specific antibodies.³⁹

Nowadays there are other viruses related to villus atrophy and epithelial vacuolation in swine that are included in the differential diagnosis. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), sapovirus, norovirus and kobuvirus should be included in the differentials of RV^{9, 10, 22, 44}.

The purpose of this paper was to describe RV diarrhea outbreaks in nursery piglets including macroscopic and histological description, RV immunohistochemical findings, bacteriological isolation and enteric virus RT-PCR assay.

Materials and methods

Sample selection and necropsies

In this study, 34 suckling piglets with diarrhea were analyzed during four outbreaks that occurred in 2011, 2012 and 2013. The farms affected were located in cities from the middle east and north of Rio Grande do Sul (RS) state, and south of Santa Catarina (SC) state, both in the South of Brazil. The team of the Veterinary Pathology Sector of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) visited the farms where the outbreaks occurred and performed necropsies of the affected piglets for diagnostic

purpose. Swine that were severely dehydrated and in poor body condition were euthanized with a barbiturate overdose for humane reasons. In 4 regions of the South of Brazil, 32 piglets were necropsied. Additionally, refrigerated and 10% buffered-formalin fixed intestinal samples from 2 animals belonging to the second outbreak were sent by Veterinary practitioners who attended one of those outbreaks.

Samples of 34 swine were collected and fixed in 10% buffered-formalin solution for histological and immunohistochemical studies. Intestinal virus assay through RT-PCR and bacteriological culture and isolation were made in 30 samples that were kept refrigerated for 48h. Four piglets, 1 from the first and 3 from the fourth outbreak, were not included in the enteric virus assay and in the bacteriological culture due to their advanced state of autolysis. Additionally, in 2 outbreaks feces were collected directly from the rectum of piglets not submitted to necropsy and subsequently were sent in pools for RV RT-PCR.

Histology

After fixation in 10% buffered-formalin solution and paraffin embedding, the samples were cut in 3-5 micrometer thick sections and stained with hematoxylin and eosin (HE). Sections of jejunum and ileum, colon and cecum, brain, cerebellum, lung, liver, kidney, heart, stomach, skeletal muscle, mesenteric lymph nodes and spleen were examined.

IHC

Sections of jejunum, ileum, and colon from all 34 samples were submitted to the IHC technique using the streptavidin-biotin linked to peroxidase. Endogenous peroxidase blocking was performed through incubation of the sections in a 10% hydrogen peroxide solution diluted in methanol for 15 minutes. Citrate buffer (pH 6,0) was applied for antigen recovery, at 125°C for 7 minutes.

Antibody against VP6 from group A RV^a was diluted in 1:100 in phosphate buffered saline solution (PBS) and applied to the slides in a humid chamber for 14 to 16 hours (overnight) at 4°C. Subsequently, slides were incubated with secondary biotinilated antibody linked to streptavidin-peroxidase^b for 20 minutes for each solution. Reaction was revealed with 3-amino-9-ethylcarbazol (AEC).^c Slides were counterstained using Mayer's hematoxylin and mounted in an aqueous media.^d A known positive section of swine intestine containing fragments of jejunum and ileum was used as the positive control. Histological sections of the positive control incubated with PBS were used as negative controls.

It was performed an examination of positive intestinal sections in high power fields (a total magnification of 400x) in positive sections of small intestine and a positive cell per field (CPF) counting was established using the average of 10 fields. Sections with a CPF count under 1 were considered with a mild IHC labeling, whilst a CPF count between 1 and 1.5 was considered moderate and a CPF above 1.5, marked.

Enteric Virus Assay

Fecal samples of 2 pools and intestinal fragments of 30 animals kept refrigerated for 48h were sent to the Virology Sector in the Londrina University (UEL), where detection of intestinal virus was performed using RT-PCR. RT-PCR techniques were applied for RV (groups A, B and C), coronavirus (TGEV and PEDV), SaV, NoV and kobuvirus (Aichi virus C).

RT-PCR was performed for the detection of group A RV using 2 pairs of primers. The first¹⁹ amplified partially the gene that codifies the viral protein 4 (VP4), generating a product of 876bp. The second pair of primers amplified a product of 1062bp, present in the viral protein 7 (VP7) gene.²¹ For the detection of group B RV, a previously described semi-nested RT-PCR²⁰ was utilized. The technique amplified a product of 434bp, which

corresponded to a portion of the non-structural protein 2 (NSP2). Primers described previously² were used in the RT-PCR to detect group C RV, resulting in a product of 270bp corresponding to a portion of the viral protein 6 (VP6) codifying gene.

The presence of other enteric viruses was evaluated through RT-PCR. Two distinct RT-PCR techniques^{30,33} were applied to detect coronaviruses that cause porcine epidemic diarrhea (PED) and transmissible gastroenteritis (TGE). The length of the products was of 377bp and 859bp, respectively. For norovirus (NoV), the RT-PCR applied (Reusken et. al., unpublished) resulted in a product of 181pb. The RT-PCR for sapovirus²⁸ amplified a product of 331bp. The kobuvirus RT-PCR⁴³ amplified a product of 216 bp.

Bacteriological culture

Bacteriological culture and isolation was performed in 30 samples. Fragments of colon and small intestine with contents were send to the UFRGS Preventive Veterinary Medicine Laboratory to aerobic and anaerobic culture according to laboratory protocols.^{25, 41, 42, 48}

Results

The outbreaks occurred from May of 2011 to August of 2013. In the first outbreak, three farms were visited, in the third outbreak two farms were visited, and one farm was visited in the second and fourth outbreaks. All piglets studied presented liquid to pasty diarrhea, dehydration and weight loss, vaccination against rotavirus was not used in any of the farms. Swine studied aged from 1 to 20 days. Detailed clinical data from each farm analyzed are summarized in Table 1.

All swine necropsied presented emaciation and dehydration, liquid to pasty contents in the cecum, colon, rectum and perineum, and distention of intestinal walls. Piglets also presented stomach full of contents in outbreaks 2 and 3.

The most frequent histological lesions were villus atrophy (29/34), vacuolation of epithelial cells on the tip of the villi (27/34) and cell debris in the *lamina propria* of the small intestine (20/34) (Figure 1). Other lesions observed in the small intestine are in Table 2.

In cecum and colon, desquamation and necrosis of superficial cells occurred in 8 cases (23.5%). Mesenteric edema was observed in 4 cases (11.8%). In 3 cases (8.8%) there was fibrin exudate in the mesentery with neutrophils in 1 of these. Bacteria suggestive of *E. coli* adhered to the mucosal surface was observed in 8 cases. Other findings included congestion in the submucosa in 2 cases (5.8%), dilation of lacteal vessels in 2 cases (5.8%), perivascular neutrophilic infiltrate in the mesentery with fibrin in 1 case (2.9%).

Positive IHC staining occurred in 21 of the 34 cases (61.8%) (Figure 2). Marked IHC staining was observed in 5 cases of Outbreak 1. Outbreaks 3 and 4 showed no cases with marked staining and 1 case of outbreak 2 was stained markedly (Table 3). CPF average of the positive slides in outbreak 1 achieved 7.4, however, in outbreak 2 it was 1.3 and in outbreak 3, average CPF count was of 0.7, and in outbreak 4 it was 1.2. Patterns of labeling differed in outbreaks 1 and 4 from outbreaks 2 and 3, while in the aforementioned outbreaks it appeared as multiple granules occupying all the cytoplasm, in outbreaks 2 and 3 it appeared as strongly stained oval to round structures in close proximity to the nucleus.

Enterocyte staining on the tip of the villi occurred in 100% of the positive cases in the jejunum and ileum, while in the proximal 2/3, 86% of the cases labeled. Duodenum enterocytes labeled in 1 case of the first outbreak. There was no IHC staining in the crypt cells and in enterocytes of the cecum and colon. Outbreak 1 had 70% of cases staining positive in the IHC, outbreak 2 presented 83% of cases positive, 67% of the cases were

positive in outbreak 3, and 45% in outbreak 4. IHC staining intensities are summarized in Table 3.

RV was detected by RT-PCR in 66.7% of the cases (20/30) and in the 2 pools analyzed. Group A RV was detected in 7 of the 30 intestinal fragments, all of them in the first outbreak, group B RV occurred in 6 cases of outbreaks 1 and 4 and group C RV was present in 17 of the samples belonging to all outbreaks reported in this study. Simultaneous detection of groups A, B and C rotaviruses occurred in 1 case, RV from groups A and C were positive in 4 cases, and 3 cases were positive for groups B and C RV. Single infection with RVA and RVB occurred in 1 case each, and group C RV was the only RV detected in 9 cases (Table 4). The 2 fecal pools analyzed were positive, the 1st outbreak for RV A and the 3rd outbreak for RV A and C.

Non-hemolytic *Escherichia coli* was isolated in 22 of the 30 cases (73%) submitted to bacteriological tests. *E. coli* α -hemolytic was isolated in 4 cases (13%). *Clostridium* sp. was isolated in 15 cases (50%), 7 of these were suggestive of *Clostridium perfringens* (23%) (Table 6). There was no bacterial growth in 3 samples of the first outbreak.

Sapovirus was detected in 8 samples, 5 from the first and 3 from the second outbreak. Norovirus was present in 2 samples, both from the first outbreak. Kobuvirus was detected in 11 samples, 6 of these belonged to the fourth outbreak, 4 were from outbreak 3 and 1 was from outbreak 2. All samples were RT-PCR negative for PEDV and TGEV.

Discussion

Rotaviruses from groups A, B and C affect piglets from farrowing to nursery, with a high prevalence in piglets from 3 to 6 weeks of age that decreases until 8 weeks of age.^{18, 53, 54} Hence, the sampling of the cases presented here aimed only diarrhea outbreaks affecting farrowing house piglets, with 64.7% aging less than 10 days. None of the farms studied applied RV vaccine in the herd. Sows can shed RV shortly before and after

parturition⁶, moreover, piglets that receive colostrum and milk from vaccinated sows show significantly higher levels of passive protection.²⁴

Moderate to severe diarrhea and dehydration were present in all cases, and at necropsy, colon contents from all piglets were pasty to liquid. RV causes diarrhea through several mechanisms. Replication in the cytoplasm promotes reduction of intestinal disaccharidase enzyme activity through the NSP4, causing accumulation of carbohydrates in intestinal lumen, hence impairing water intake.³⁷ Furthermore, RV non-structural protein 4 (NSP4) inhibits Na⁺-D-glucose symporter (SGLT1), reducing water reabsorption, and induces an excessive secretion of Cl⁻ through Ca⁺ dependent channels.³⁷ RV also induces activation of secretory reflexes in the enteric nervous system,³² but mechanisms regarding involvement of enteric nervous system in rotaviral diarrhea remain unclear.³⁷

Villus atrophy was present in 85.3% of all intestines studied, this lesion is frequently described in rotaviral enteritis.¹⁴ This lesion occurs due to extensive superficial cell loss, which is followed by villus contraction and emergence of regenerated epithelium from the crypts. Coronavirus, other enteric viruses such as sapovirus and norovirus, and coccidial infections can also cause this lesion.⁹ Epithelial vacuolation was observed in 79.4% of the cases. The same lesion was observed in former studies involving mice,^{11, 32} ME examinations in one of these studies revealed an amorphous material with cell debris inside the vacuoles.¹¹ It is proposed that RV alters structure and function of enterocytes by the accumulation of NSP4 in a post-endoplasmic reticulum, microtubule-associated membrane compartment⁵⁵ leading to the epithelial vacuolation. Cell debris in the villi *lamina propria* were found in 58.8% (20/34) of the cases, suggesting phagocytosis of apoptotic enterocytes by dendritic cells (DC). In the small intestines, a dendritic cell lineage locally phagocytes apoptotic epithelial cells to present antigens to naïve CD4⁺T

lymphocytes.²⁶ RV induces apoptosis in enterocytes, particularly in the upper parts of the villi.⁷

The commonest lesion occurring in the colon was superficial necrosis of enterocytes, present in 8 cases. Half of these intestines belonged to outbreak 3. Epithelial damage and RV detection in the colon was observed in gnotobiotic calves inoculated with RV.⁵¹ Among these samples, 6 were RV IHC positive in the small intestine, but not in the colon.

IHC staining revealed RV antigens in 21 cases (61.8%). The first outbreak had the most intense staining, with 5 of the 8 positive cases staining markedly. RV from groups A, B and C were detected in this outbreak, the polyclonal antibody against RV VP6 used was developed with Nebraska Calf Diarrhea Virus (NCDV), lineage belonging to group A of RV.

Samples from outbreaks 1 and 4 that were RT-PCR negative for group A RV, but positive for group C or groups B and C rotaviruses exhibited a regular whole-cytoplasm pattern of IHC staining, identical to the staining observed in group A RV RT-PCR positive samples presented in outbreak 1. VP6 possess high antigenic distinction between rotaviruses belonging to separate groups⁴⁹, nonetheless, some studies show evidence of a higher homology between rotaviruses belonging to groups A and C⁸ and a high heterogeneity among group C rotaviruses³⁸.

Nevertheless, samples from outbreaks 2 and 3, in which only RV from group C was detected by RT-PCR, presented a less intense IHC labeling appearing as isolated round spots positioned next to the nucleus, suggestive of viroplasms. Viroplasms are electron-dense structures formed inside the infected cells to RV replication.¹⁶

Viroplasms fuse among each other moving towards the perinuclear region, possessing a high concentration of VP6 in its outer layer,¹⁶ it is likely that the IHC labeling observed in the outbreaks 2 and 3 stained viroplasms. VP6 has a high variability among

RV belonging to different groups,⁴⁹ with an occasional homology between RV from groups A and C.⁸ It is possible that the lineage of the group C RV present in outbreaks 1 and 4 was different from the lineage of the RV present in intestinal samples of outbreaks 2 and 3. Therefore, IHC labeling of these outbreaks would be occurring in viroplasms, because there is a high concentration of VP6 in these structures, resulting in positive results even with a low level of complementarity with the antibody used.

Yet, conclusions about phenotypic differences in the VP6 among group C RV from outbreaks 2 and 3, and from outbreaks 1 and 4 cannot be drawn from the IHC staining difference observed among outbreaks, since VP6 sequences were not assessed in this study.

The pattern and intensity of the IHC labeling observed in outbreaks 2 and 3 could also be attributed to the stage and severity of infection at the necropsy moment. RV persists in the intestine of infected piglets for 5 days, with a higher titer in the first 22 hours post infection and subsequent 48 hours with a decreased amount of viral antigen followed by a second peak at 60 hours post infection.¹⁴ In mice, a peak of replication in the enterocytes is observed at 1 day post infection with a decrease at 2 days post infection and a second peak in the fourth day after RV infection.⁷

Co-infections between rotaviruses belonging to groups A, B e C have been detected in swine diarrhea outbreaks.^{38, 40} Most of the infections involving RVC are mixed with rotaviruses from group A or B.⁴⁰ Co-infections with rotaviruses from multiple groups are more common in weaned pigs, where half of the rotaviruses detected are from groups B and C, while in nursing pigs group A RV is detected in $\frac{3}{4}$ and groups B and C rotaviruses are detected in $\frac{1}{4}$ of the animals.²⁷ Conversely, in this study, single RVC detection from outbreaks 2 and 3 occurred in 7 intestines, corresponding to 63.6% of the single-group RV detections, in these outbreaks animals were older than in outbreaks 1 and 4. Moreover,

mixed RV groups detection in intestines occurred only in outbreaks 1 and 4, where all animals were less than 2-weeks old.

Group C RV is described as an important cause of diarrhea outbreaks in pigs.⁴⁰ Group C RV was detected in 17 samples (56% of the analyzed samples), 9 of these were single group detections. In Brazilian swine herds the prevalence of infections involving group C RV nowadays is higher than previously described, this is attributed to the improvement in detection techniques sensitivity.⁴⁰ In Italy, group C rotaviruses has been found as the most prevalent enteric virus, detected in 100% of the farms studied, nevertheless, single detection of group C RV was found in only 2.9% of the samples.³⁸

Clostridium sp. was isolated from 4 samples in outbreak 2 and from all samples in outbreak 3. This bacterium is part of intestinal commensal flora of warm-blooded animals,^{35,50} therefore, it can be isolated from intestines without diarrhea.³⁵ Nevertheless, *Clostridium perfringens* type A produces vascular and epithelial damage in the small and large intestines and villous edema,⁵⁰ and large amounts of bacilli in the intestinal lumen.¹³ However, in the presence of other enteric pathogens, *C. perfringens* is not considered as the major cause of diarrhea.¹³ Since RV was detected in both outbreaks, there was no observation of large amounts of intraluminal bacilli, and lesions observed were characteristic of RV infection, it is more likely that this agent is not interfering in intestinal lesions. Furthermore, vaccination against *Clostridium perfringens* was used in the farm studied in outbreak 2.

Macroscopic and histological analysis did not found any lesions suggestive of *Clostridium difficile* infection in any outbreak. A recent study found a significant association between macroscopic and microscopic lesions and detection of this agent and also a significant association between the absence of lesions and the non-detection of *C. difficile*.¹⁵

Escherichia coli was isolated from all outbreaks studied, isolation of α -hemolytic *E. coli* occurred only in 4 cases of outbreak 4. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strains possess fimbriae that allow them to attach the intestinal mucosa and resist to peristaltic clearance mechanisms. Histologically, the only feature observed is the presence of ETEC attached to the intestinal mucosa.⁹ RV infection causes an imbalance in intestinal colonization, giving an advantage to adhesion factors-possessing *E. coli* strains, moreover, diarrhea produced by both agents is more severe than by either of them alone^{17, 34}. Coccobacillary bacteria (suggestive of *E. coli*) attached to the mucosa was observed in a total of 13 cases, 9 occurred in histological sections of small intestines and 7 in sections of colon. However, genotyping of fimbriae and toxins would be necessary to draw any conclusions about the role of this bacterium in these outbreaks.

All samples were negative for TGEV and PEDV, a former survey in Brazil involving serologic evidence of TGEV infection also did not find positive results.⁵ There are no surveys showing the presence of PEDV in Brazil to date.

Sapovirus was detected in outbreaks 1 and 2 and norovirus was detected only in 2 samples from outbreak 1. Norovirus is a member of the *Caliciviridae* family associated with foodborne infections in humans⁵² and causes moderate villus atrophy, epithelial attenuation and subtle duodenal edema in the swine intestine.¹⁰ Sapovirus is also a member of the *Caliciviridae* family, that causes diarrhea and lesions of mild to severe villus atrophy, crypt hyperplasia and edema of the submucosa in the duodenum and jejunum, but not in the ileum. Epithelial vacuolation and attenuation in the duodenum, jejunum and ileum was also described in gnotobiotic piglets infected with Sapovirus.²² In a prevalence study involving norovirus and sapovirus detection in swine, noroviruses were detected exclusively in subclinically infected finisher pigs. Despite 98 nursing piglets tested, none was positive for norovirus. Nevertheless, sapovirus was detected in

swine from all ages, but with a significantly lower (21%) prevalence in nursery piglets. Co-infection with sapovirus and norovirus was observed in 27% of the finisher pigs. No clinical signs were observed in norovirus or sapovirus-positive animals.⁵² RV and norovirus were the most common infectious agents in cases of watery diarrhea in children from Korea.³¹ Since this study involves swine, and norovirus was only detected in 2 samples, it is unlikely that norovirus was contributing to clinical signs and lesions observed. Conversely, sapovirus was detected in 26,7% of the cases in this study, with 5 samples positive for RV and sapovirus in the first outbreak, 2 samples positive for these two agents in the second outbreak, and in 1 sample from this outbreak no RV was detected by RT-PCR or IHC. This finding suggests that infection with this agent could follow RV infection prolonging the lesions and clinical signs. Sapovirus and RV were detected simultaneously in 4% of samples from nursing piglets with diarrhea in Japan.²⁹

Kobuvirus was detected in 11 samples from outbreaks 2, 3 and 4. Interestingly, 6 of these samples belonged to outbreak 4. Kobuvirus belongs to the *Picornaviridae* family, it was first isolated from an oyster-related acute gastroenteritis case in a human in Japan.⁴⁵ It has been found an association with kobuvirus detection and diarrhea in swine, with the highest level of detection in nursery piglets.⁴ Although until the present time there are no studies reproducing the disease and describing lesions related solely to this virus in swine.⁴⁴

This study has described RV infections in farrowing house piglets. Pathological findings and clinical history have narrowed the diagnosis towards RV infection, and immunohistochemistry has confirmed the diagnosis of rotaviral enteritis. RT-PCR revealed group C RV as the prevailing agent of the cases studied, reinforcing the importance of this agent in the etiology of swine diarrhea in the South of Brazil. RT-PCR has also shown the presence of recently described enteric viruses such as sapovirus,

norovirus and kobuvirus in diarrhea cases from the south of Brazil. RV associations with sapovirus and kobuvirus require further studies and development of antigen-detection techniques such as IHC to be fully comprehended.

Acknowledgements

The authors thank their colleagues and professors for the technical support.

Sources and manufacturers

- a. Rotavirus Omnitope™, polyclonal serum, ViroStat, Portland, ME.
- b. K0690, LSAB-HRP™, Dako, Carpinteria, CA.
- c. K3464, AEC Substrate-Chromogen, Dako, Carpinteria, CA.
- d. S1964, Ultramont Permanent Mounting Medium, Dako, Carpinteria, CA.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no conflicts of interest in the publication of this article.

Funding

Financial support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

1. Alam MM, Kobayashi N, Ishino M, et al.: 2007, Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. *Arch Virol* 152:199-208.
2. Alfieri AA, Leite JPG, Alfieri A, et al.: 1999, Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription–polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. *J Virol Met* 83:35-43.

3. Amimo JO, Vlasova AN, Saif LJ: 2013, Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. *Vet Microbiol* 164:27-38.
4. Barry AF, Ribeiro J, Alfieri AF, et al.: 2011, First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. *Infect Genet Evol* 11: 1811-1814.
5. Barthasson DL, Brito WMED, Sobestiansky J, et al.: 2009, Ocorrência de infecção por parvovírus suíno e gastroenterite transmissível em suínos, criados de forma extensiva, em Goiás [Occurrence of porcine parvoviral infection and transmissible gastroenteritis virus infection in swine from extensive raising systems in the state of Goiás, Brazil]. *Arq Bras Med Vet Zootec* 61: 1227-1229. In Portuguese. Abstract in English.
6. Benfield DA, Stotz I, Moore R, McAdaragh JP.: 1982, Shedding of rotavirus in feces of sows before and after farrowing. *J Clin Microbiol* 16:186-190.
7. Boshuizen JA, Reimerink JHJ, Korteland-van Male AM, et al: 2003, Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. *J Virol* 77:13005-13016.
8. Bremont M, Chabanne-Vautherot D, Vannier P, et al.: 1990, Sequence analysis of the gene (6) encoding the major capsid protein (VP6) of group C rotavirus: higher than expected homology to the corresponding protein from group A virus. *Virology* 178:579-583.
9. Brown CC, Baker DC, Barker IK: 2006, Alimentary system. *In: Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, ed. Maxie, MG, vol. 2, 5th ed, p.p.135-279. Elsevier, Guelph.
10. Cheetam S, Souza M, Meulia T, et al.: 2006, Pathogenesis of a Genogroup II Human Norovirus in Gnotobiotic Pigs. *J Virol* 80: 10372-10381.

11. Ciarlet M, Conner ME, Finegold MJ, Estes MK: 2002, Group a rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. *J Virol* 76:41-57.
12. Clark B, McKendrick M: 2004, A review of viral gastroenteritis. *Curr Opin Infect Dis* 17:461-469.
13. Collins JE, Bergeland ME, Bouley D, et al.: 1989, Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. *J Vet Diagn Invest* 1:351-353.
14. Crouch CF, Woode GN: 1978, Serial studies of virus multiplication and intestinal damage in gnotobiotic piglets infected with rotavirus. *J Med Microbiol* 11:325-334.
15. Cruz Junior EC, Salvarani FM, Silva ROS, et al.: 2013, A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. *Pesq Vet Bras* 33:963-969.
16. Eichwald C, Arnoldi, F, Laimbacher AS, et al.: 2012, Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. *PLoS One* 7:e47947.
17. Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL: 2005, *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 6:17-39.
18. Gelberg HB: 1992, Studies on the age resistance of swine to group A rotavirus infection. *Vet Pathol* 29:161-168.
19. Gentsch JR, Glass RI, Woods P, et al.: 1992, Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30:1365-1373.

20. Gouvea V, Allen JR, Glass RI, et al.: 1991, Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 29:519-523.
21. Gouvea V, Glass RI, Woods P, et al.: 1990, Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 28:276-282.
22. Guo M, Hayes J, Cho KO, et al.: 2001, Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *J Virol* 75:9239-9251.
23. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, et al.: 1982, Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 16:473-477.
24. Hodgins DC, Kang SY, deArriba L, et al.: 1999, Effects of maternal antibodies on protection and development of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs. *J Virol* 73:186-197.
25. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Williams ST: 1994, Group 5: facultatively anaerobic gram-negative rods *In: Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 9th ed, pp. 177-179, William & Wilkins, Baltimore, MD.
26. Jang MH, Sougawa N, Tanaka T, et al.: 2006, CCR7 is critically important for migration of dendritic cells in intestinal lamina propria to mesenteric lymph nodes. *J Immunol* 176:803-810.
27. Janke BH, Nelson JK, Benfield DA, Nelson EA:1990, Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. *J Vet Diagn Invest* 2:308-311.

28. Jiang X, Huang PW, Zhong WM, et al.: 1999, Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J Virol Methods* 83:145-154.
29. Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H: 2006, Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest* 18:350-354.
30. Kim SY, Song DS, Park BK: 2001, Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. *J Vet Diagn Invest* 13:516-520.
31. Koh H, Baek SY, Shin JI, et al.:2008, Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. *J Korean Med Sci* 23:937-940.
32. Kordasti S, Istrate C, Banasaz M, et al.: 2006, Rotavirus infection is not associated with small intestinal fluid secretion in the adult mouse. *J Virol* 80:11355-11361.
33. Kweon CH, Lee JG, Han MG, Kang YB: 1997, Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 59:231-232.
34. Lecce JG, Balsbaugh RK, Clare DA, King MW: 1982, Rotavirus and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weanling diarrhea of pigs. *J Clin Microbiol* 16:715-723.
35. Leser TD, Amenuvor JZ, Jensen TK, et al.: 2002, Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Appl Environ Microbiol* 68:673-690.
36. López S, Arias CF: 2004, Multistep entry of rotavirus into cells: a versaillesque dance. *Trends Microbiol* 12:271-278.

37. Lorrot M, Vasseur M: 2007, How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? *Virology* 4:31-36.
38. Martella V, Bányai K, Lorusso E, et al.: 2007, Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Veterinary Microbiology* 123:26-33.
39. Matthijssens J, Otto PH, Ciarlet M, Desselberger U, et al.: 2012, VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Archives of Virology* 157:1177-1182.
40. Medici KC, Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA: 2011, Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Swine Health Production* 19:146-150.
41. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR.: 1994, Chapter 17. *Clostridium* species. *In: Clinical Veterinary Microbiology*, 9th ed, pp. 191, Mosby, London, UK.
42. Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR.: 1994, Chapter 18. *Enterobacteriaceae*. *In: Clinical Veterinary Microbiology*, 9th ed, pp. 209, Mosby, London, UK.
43. Reuter G, Boldizsár A, Pankovics P: 2009, Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus *Kobuvirus*, family *Picornaviridae*. *Archives of Virology* 154:101-108.
44. Reuter G, Boros A, Pankovics P: 2011, Kobuviruses - a comprehensive review. *Review of Medical Virology* 21:32-41.
45. Reuter G, Kecskeméti, Pankovics P: 2010, Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary. *Emerging Infectious Diseases* 16:696-698.

46. Rovida F, Campanini G, Sarasini A, et al.: 2013, Comparison of immunologic and molecular assays for the diagnosis of gastrointestinal viral infections. *Diagn Micr Infec Dis* 75:110-111.
47. Saif LJ: 2011, Chapter 15. *Reoviridae*. In: Fenner's Veterinary Virology IV, ed. MacLachlan NJ, Dubovi EJ, 4th ed, pp. 276-290. Elsevier, Oxford, UK.
48. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, et al.: 2010, Chapter 12. Clostrídios sulfito-redutores. [Sulphite reducing clostridia] In: Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e água, 4th ed, pp. 177, Livraria Varela, São Paulo, Brazil. In Portuguese.
49. Snodgrass DR, Herring AJ, Campbell I, et al.: 1984, Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. *J Gen Virol* 65:909-914.
50. Songer JG, Glock RD: 1998, Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. *Swine Health Prod* 6:223-225.
51. Varshney KC, Bridger JC, Parsons KR, et al.: 1995, The Lesions of Rotavirus Infection in 1- and 10-day-old Gnotobiotic Calves. *Vet Pathol* 32:619-627.
52. Wang QH, Souza M, Funk JA, et al.: 2006, Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *J Clin Microbiol* 44:2057-2062.
53. Wakuda M, Ide T, Sasaki J, Komoto S, et al.: 2011, Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. *Emerg Infect Dis* 17:1491-1493.
54. Will LA, Paul PS, Proescholdt TA, et al.: 1994, Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. *J Vet Diagn Invest* 6:416-422.

55. Xu A, Bellamy R, Taylor JA: 2000, Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *The EMBO Journal* 19:6465-6474.

Tables

Table 1. Summarized clinical data of affected piglets per farm affected in outbreaks occurring in South of Brazil from 2011 to 2013 (n=34).

Outbreak	Location	Month that started	Number of sows	Herd type	Number of piglets analyzed	Age of piglets (days)	Immunization used	Treatment	Diarrhea	Weight Loss	Dehydration
1	Middle east of RS	May/2011	520	Farrow-to-wean	7	4 to 12	<i>E. coli</i>	Sulfonamide, gentamicin, enrofloxacin, penicillin	Liquid	(+)	(+)
1	Middle east of RS	May/2011	1100	Farrow-to-wean	2	5	<i>E. coli</i>	Sulfonamide, gentamicin, enrofloxacin, penicillin	Liquid	(+)	(+)
1	Middle east of RS	May/2011	2200	Farrow-to-wean	2	3	<i>E. coli</i>	Sulfonamide, gentamicin, enrofloxacin, penicillin	Liquid	(+)	(+)
2	North of RS	December/2011	1100	Farrow-to-wean	6	15 to 20	<i>E. coli</i> and <i>C. perfringens</i>	Toltrazuril	Liquid to pasty	(+)	(+)
3	South of SC	February/2012	300	Farrow-to-finish	4	10 to 14	not used	Toltrazuril, gentamicin and amoxicillin	Liquid	(+)	(+)
3	South of SC	February/2012	250	Farrow-to-wean	2	9	not used	Toltrazuril, gentamicin and amoxicillin	Liquid	(+)	(+)
4	North of RS	August/2013	840	Farrow-to-finish	11	1 to 6 days	not used	Ceftiofur and sulfonamide	Liquid	(+)	(+)

Table 2. Resume of lesions observed in the small intestine of piglets necropsied per outbreak occurring in South of Brazil from 2011 to 2013

(n=34).

Outbreak (n=34)	Villus atrophy	Crypt hiperplasia	Epithelial vacuolation	Epithelial atenuation	Lacteal dilation	Cell debris	Mixed infiltrate	Lymphocytic infiltrate	Neutrophilic infiltrate	Fibrin exsudate	Bacteria adhered	Enterocyte necrosis	Edema	Coccidia
1	64%	0%	64%	27,3%	9.10%	72.7%	36.40%	27.3%	0%	18.2%	27.3%	9.1%	0%	0%
2	100%	0%	83.30%	50%	50%	16.7%	0%	16.7%	0%	0%	50%	33.3%	0%	0%
3	100%	0%	83.30%	66.7%	0%	66.7%	0%	16.7%	0%	0%	33.3%	16.7%	16.7%	33.3%
4	90.9%	18.2%	90.9%	18.2%	9.1%	63.6%	0%	0%	9.1%	0%	9.1%	9.1%	0%	0%
Total	85.3%	5.9%	79.4%	35.3%	14.7%	58.8%	11.8%	14.7%	2.9%	5.9%	26.5%	14.7%	2.9%	5.9%

Table 3. Cases staining different intensities* of IHC per RV outbreak in piglets from the South of Brazil in 2011-2013 (n=34).

Outbreak	Negative		Positive	
		Mild	Moderate	Marked
1	3	0	3	5
2	1	1	2	2
3	3	3	0	0
4	6	4	1	0
Total	13	8	6	7

* Classification according to cell per field (CPF) counting. Mild: <1 CPF; Moderate: 1-1.5 CPF; Marked: >1,5 CPF.

Table 4. RV infection cases in swine with single and multiple RV groups detected using RT-PCR per outbreak.

Outbreak	Group of rotavirus detected						
	Single group detection			Mixed group detection			
	A	B	C	ABC	AC	AB	BC
1	1	0	2	1	4	1	1
2	0	0	3	0	0	0	0
3	0	0	4	0	0	0	0
4	0	1	0	0	0	0	2
Total	1	1	9	1	4	1	3

Table 5. Bacterial isolation for complementary diagnosis of RV associated diarrhea cases occurring in the South of Brazil from 2011 to 2013

Outbreak	<i>E. coli</i> (non-hemolytic)	<i>E. coli</i> (α-hemolytic)	<i>Clostridium</i> sp.
1	6/10	(-)	(-)
2	6/6	(-)	4/6
3	6/6	(-)	6/6
4	4/8	4/8	(-)

Figure legends

Figure 1. Histologic sections of a swine small intestine. **A.** Section of small intestine with severe villus atrophy and fusion, cellular debris in the *lamina propria* (arrow) and vacuolated enterocytes. HE, Bar = 250 μ m. **B.** Atrophic villus with vacuolated enterocytes on its distal portion and multiple coccobacillary bacteria adhered to the surface of enterocytes. HE, Bar = 60 μ m.

Figure 2. IHC stained histologic sections of small intestines from outbreaks 1 and 3. **A.** IHC-positive intestinal section from a swine belonging to outbreak 1 presenting a regular staining throughout the cytoplasm, RV from groups A and C were detected by RT-PCR in this sample. **B.** IHC-positive intestinal section from a swine belonging to outbreak 3, only group C RV was detected in this sample. The positive IHC staining is shown as strongly labeled single points next to the nucleus. AEC and Mayer's Hematoxylin, Bar = 60 μ m.

Figures

Figure 1

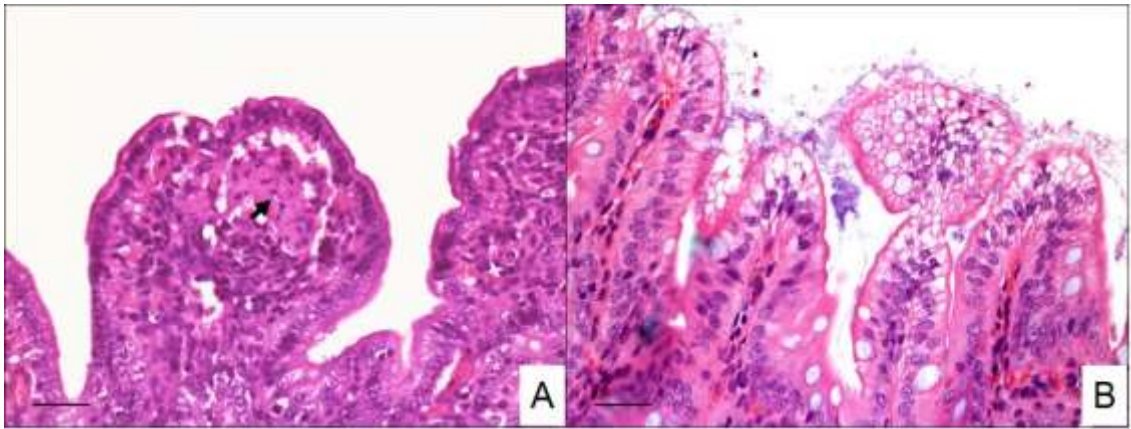
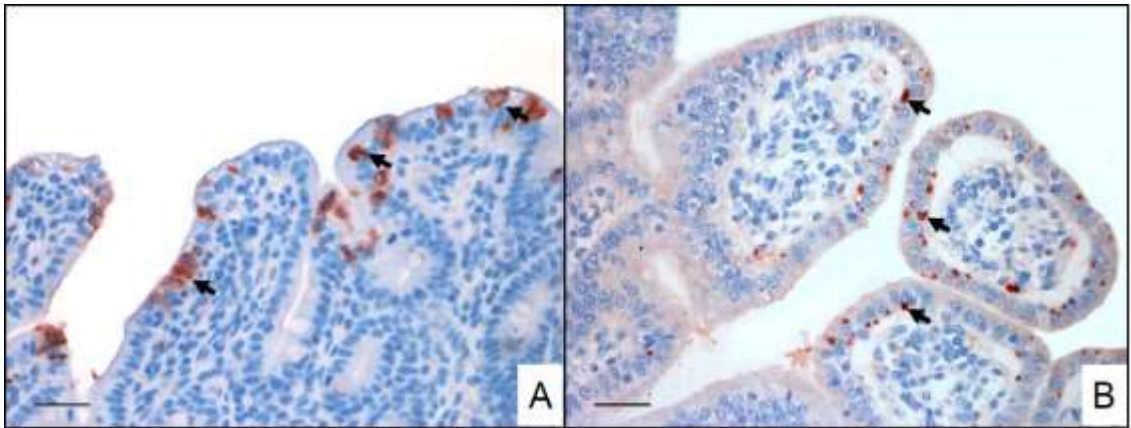


Figure 2



4. DISCUSSÃO GERAL

A diarreia causa está entre as maiores causas de perda de peso em leitões além de causar prejuízos econômicos através de gastos com tratamento (JOHANSEN *et al.*, 2004). Estimativas apontam perdas milionárias devido a diarreia na suinocultura (BENNET & IJPELAAR, 2005). Entre as diarreias de origem viral em leitões de maternidade, a causada por RV é uma das mais frequentemente diagnosticada (KATSUDA *et al.*, 2006).

O RV está entre os principais agentes causadores de diarreias de suínos em vários países (WILL *et al.*, 1994; WIELER *et al.*, 2001; KATSUDA *et al.*, 2006; LIPPKE *et al.*, 2011, CRUZ JUNIOR *et al.*, 2013). Com a ausência de PED e TGE atualmente no Brasil, ele se torna o principal vírus relacionado a esta enfermidade neste país (BRENTANO *et al.*, 2002; BARTHASSON *et al.*, 2009).

A prevalência de RV é maior entre leitões de maternidade (GELBERG, 1992; WILL *et al.*, 1994; ALFIERI *et al.*, 1999b; HALAIHEL *et al.*, 2010; WAKUDA *et al.*, 2011). Este fator definiu a seleção de amostras para o estudo apresentado.

Na fase de maternidade, os suínos apresentam uma grande dependência da imunidade passiva para não adquirir a infecção por RV (HODGINS *et al.*, 1999). Além disso há evidências de que algumas matrizes excretam RV no período puerperal (BENFIELD *et al.*, 1982; SAIF & FERNANDEZ, 1996), aumentando ainda mais a suscetibilidade de leitões de maternidade à infecção por RV. Nenhum dos rebanhos estudados neste trabalho praticava essa medida profilática.

O trabalho realizado investigou surtos de diarreia em suínos de maternidade causada por RV através de achados de necropsia, histológicos e imuno-histoquímicos presentes em diferentes grupos de RV detectados por RT-PCR.

A faixa etária dos suínos afetados, a ausência de vacinação e os sinais clínicos observados sugerem uma ampla variedade de possíveis agentes etiológicos (WITTUM *et al.*, 1995; WIELER *et al.*, 2001; KATSUDA *et al.*, 2006; LIPPKE *et al.*, 2011). Desta forma, foi necessária uma investigação abrangente, com o uso de diversas técnicas de diagnóstico para se confirmar RV como o agente relacionado todos os surtos.

Se o histórico clínico e os achados macroscópicos não limitaram as possibilidades de diagnóstico, a histologia foi decisiva em direcionar o diagnóstico para RV. Os achados histológicos deste estudo são altamente indicativos de enterite viral (BROWN *et al.*,

2006), uma vez que coccídios, que também causam atrofia de vilosidades, foram observados em poucos casos, além disso, outros vírus que causam lesões semelhantes às observadas, como TGE e PED, não foram detectados neste estudo. O circovírus suíno tipo 2 (em inglês, PCV2) tem sido associado com lesões intestinais em suínos (ZLOTOWSKI *et al* 2008), no entanto, no presente trabalho não foram observadas lesões histológicas sugestivas de infecção por PCV2. Além disso, a infecção por PCV2 inicia na fase de creche e os leitões estudados pertenciam à fase de maternidade, por isso não foi incluída a pesquisa deste vírus no material analisado.

A atrofia de vilosidades foi a lesão mais frequentemente observada neste estudo, muitos estudos a relacionam com infecção por RV (CROUCH & WOODE, 1978; SALIM *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2011). Ela ocorre pela perda de células superficiais, que é seguida de contração das vilosidades e ascensão das células das criptas. Essa lesão também pode ser causada por coronavírus, bactérias enteroinvasivas e coccídios (BROWN *et al.*, 2006). A atrofia de vilosidade é seguida de atenuação do epitélio, que assume uma forma cuboidal a pavimentosa (CROUCH & WOODE, 1978; BROWN *et al.*, 2006). A baixa frequência de atenuação epitelial em contraste com a atrofia de vilosidades observada se deve à fase da infecção, já que em até 36h após a infecção o epitélio pode permanecer normal em muitas áreas e a contração das vilosidades envolve miofibroblastos e possivelmente o sistema nervoso entérico (BOSHUIZEN *et al.*, 2003; CROUCH & WOODE, 1978).

A vacuolização epitelial foi o segundo achado histológico mais frequente neste estudo. Esta lesão foi observada em camundongos (CIARLET *et al.*, 2002; KORDASTI *et al.*, 2006) e também em infecções experimentais em suínos (TZIPORI *et al.*, 1989). A microscopia eletrônica revelou material amorfo e debris celulares dentro desses vacúolos (CIARLET *et al.*, 2002). É sugerido que o acúmulo de NSP4 no retículo endoplasmático altere a função e estrutura dos enterócitos causando sua vacuolização (XU *et al.*, 2000; SURENDRAN, 2008).

No cólon, a necrose superficial de enterócitos foi observada em oito casos. Dano epitelial aliado a detecção de RV por IHQ foi observado em bovinos gnotobióticos inoculados com RV, sugerindo que o vírus também infecta enterócitos do ceco e do cólon (VARSHNEY *et al.*, 1995). Entre as amostras deste estudo, seis apresentaram marcação por IHQ para RV no intestino delgado, porém não houve marcação em ceco e cólon.

Marcação positiva para RV na IHQ ocorreu em 21 (61.8%) casos estudados. A marcação acentuada ocorreu mais no surto 1, com cinco dos oito positivos apresentando

esse grau de positividade com grânulos espalhados pelo citoplasma como previamente descrito (GELBERG *et al.*, 1990). Detectou-se nesse surto, através de RT-PCR, RV dos grupos A, B e C. Na IHQ de todos os surtos utilizou-se anticorpo policlonal anti-VP6 de RV do grupo A (Nebraska Calf Diarrhea Virus – NCDV). Ainda assim, nos surtos 1 e 4, mesmo as amostras que eram negativas para RV do grupo A em RT-PCR, apresentaram marcação IHQ positiva com o mesmo padrão daquelas que eram positivas para RV do grupo A.

Por outro lado, amostras dos surtos 2 e 3 nas quais somente RV do grupo C foi detectado por RT-PCR apresentaram uma marcação diferente, na forma de pontos ovais próximos ao núcleo sugestivas de viroplasmas (EICHWALD *et al.* 2012). Viroplasmas são estruturas eletrodensas que se formam na célula para a replicação do RV (EICHWALD *et al.* 2012). Essas estruturas se fundem e ficam maiores próximas ao núcleo, possuindo uma alta concentração de VP6 na sua camada externa (EICHWALD *et al.*, 2012), é provável que a marcação imuno-histoquímica observada nos surtos 2 e 3 esteja evidenciando viroplasmas. Com isso, há a possibilidade de que a marcação tenha ocorrido somente nos viroplasmas porque ali há uma alta concentração de VP6, havendo marcação mesmo com um baixo grau de complementariedade com o anticorpo utilizado. Contudo, conclusões não podem ser tiradas a respeito de diferenças antigênicas entre as VP6 dos RV dos surtos 2 e 3, e dos surtos 1 e 4 a partir da diferença na marcação imuno-histoquímica observada entre eles, já que não foi realizado sequenciamento da VP6 nos casos.

Os viroplasmas somente aparecem três horas após a infecção (GALLEGOS & PATTON, 1989). Portanto, outra possibilidade é que o padrão e a intensidade de marcação IHQ observados nos surtos 2 e 3 seja explicado pelo estágio da infecção no momento da necropsia daqueles animais. RV persiste no intestino de suínos infectados por até cinco dias, com um título mais alto nas primeiras 22 horas pós-infecção, subsequentes 48 horas com esse título diminuído e um segundo pico após 60 horas (CROUCH & WOODE 1978). Dinâmica de infecção semelhante foi observada em infecção por RV em camundongos (BOSHUIZEN *et al.*, 2003).

A RT-PCR foi utilizada para detectar e diferenciar os RV dos grupos A, B e C. Por sua alta sensibilidade, especificidade e rapidez, esta técnica é indicada como método de escolha para diagnóstico de viroses gastrointestinais (CLARK & MCKENDRICK, 2004; ROVIDA *et al.*, 2013). Os protocolos utilizados são altamente sensíveis e

específicos para cada grupo de RV (GOUVEA *et al.*, 1990; GOUVEA *et al.*, 1991; GENTSCH *et al.* 1992; ALFIERI *et al.*, 1999a).

Coinfecções entre RV pertencentes aos grupos B e C tem sido detectadas associadas a RV do grupo A em surtos de diarreia em suínos (MARTELLA *et al.*, 2007; MEDICI *et al.*, 2011). A maioria das infecções envolvendo RV do grupo C são mistas com RV dos grupos A ou B (MEDICI *et al.*, 2011). Coinfecções com RV de múltiplos grupos são mais comuns em leitões na fase de creche, enquanto em leitões de maternidade RV do grupo A são a maioria dos RV detectados (JANKE *et al.*, 1990). Inversamente, neste estudo RV do grupo C foi o mais detectado e em nove dos 20 casos houve infecção por RV de múltiplos grupos.

RV do grupo C é um agente causador de diarreia importante para suínos (MORIN *et al.*, 1990; SMITALOVA *et al.*, 2009, MEDICI, *et al.* 2011). Em mais da metade das amostras positivas para RV do grupo C não houve detecção de RV dos grupos A e B. Em rebanhos suínos brasileiros, a prevalência de infecções com RV do grupo C atualmente é maior do que no passado, fato atribuído principalmente ao advento de técnicas de detecção mais sensíveis (MEDICI *et al.*, 2011). Na Itália, RV do grupo C foi detectado em 100% das granjas estudadas, porém detecção de RV do grupo C isolado ocorreu em somente 2,9% das amostras (MARTELLA *et al.*, 2007).

Das 30 amostras testadas por IHQ e RT-PCR para RV, houve 4 amostras negativas em ambos os testes. Duas delas pertencentes ao quarto surto. O quarto surto ocorreu em animais muito jovens, entre 1 e 6 dias. O curso da infecção por RV é de aproximadamente 5 dias e há picos de marcação com um intervalo de 48h com baixa concentração do vírus no intestino (CROUCH & WOODE, 1978; CIARLET *et al.*, 2002), portanto provavelmente nesses animais o RV já não estava mais presente ou estava em baixas concentrações não detectadas na IHQ.

Escherichia coli não hemolítica foi isolada em todos os surtos, porém no último houve a detecção de *E. coli* α -hemolítica. A infecção por RV causa um desequilíbrio na colonização intestinal normal, dando uma vantagem a linhagens de *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), que possuem fatores de adesão, e a diarreia produzida pelos dois agentes é mais severa do que a causada por um deles isoladamente (LECCE *et al.*, 1982; TZIPORI *et al.*, 1983; FAIRBROTHER *et al.*, 2005). Histologicamente, a única característica observada em casos de infecção por ETEC é a presença de cocobacilos aderidos à mucosa (BROWN *et al.*, 2006). Sem a genotipagem das bactérias isoladas não é possível tirar conclusões sobre seu papel nos casos estudados.

Clostridium sp. foi isolado de todas as amostras do surto 3, e em quatro amostras do surto 2. Como a *E. coli*, essa bactéria é parte da microbiota intestinal dos suínos (SONGER & GLOCK, 1998; LESER, 2002), portanto, pode ser isolada de intestinos sem diarreia (LESER, 2002). Todavia, *Clostridium perfringens* tipo A pode produzir dano epitelial e vascular no intestino delgado e no intestino grosso e causa edema de vilosidades (SONGER & GLOCK, 1998, SONGER & UZAL, 2005) e nas infecções causadas por *C. perfringens*, observa-se grande quantidade de bacilos na luz intestinal (COLLINS *et al.*, 1989). Contudo, essa bactéria não é considerada a causa principal de diarreia quando há outros patógenos intestinais envolvidos (COLLINS *et al.*, 1989). Com a detecção de RV nesses surtos, a ausência de grandes quantidades de bacilos e a presença de lesões características de infecção por RV nos intestinos desses animais, é provável que o papel do *Clostridium* sp. isolado não tenha significado patológico nesse surto.

Todos os casos foram negativos para coronavírus (PED e TGE). Em levantamentos anteriores para TGEV suínos realizados no Brasil também não houve positividade (BRENTANO *et al.*, 2002; BARTHASSON *et al.*, 2009).

Entre os membros da família *Caliciviridae* pesquisados neste estudo, o sapovírus foi detectado nos surtos 1 e 2, enquanto norovírus foi detectado somente em 2 amostras do surto 1. O norovírus está relacionado com infecções alimentares em humanos (WANG *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006) e causa atrofia de vilosidades moderada, atenuação epitelial e edema agudo no duodeno em suínos (CHEETHAM *et al.*, 2006). Sapovírus causa diarreia com atrofia de vilosidades, hiperplasia de criptas e edema de submucosa no duodeno e no jejuno, mas não no íleo. Vacuolização e atenuação epitelial no duodeno jejuno e íleo também foram descritos em infecções de suínos com sapovírus (GUO *et al.*, 2001). Norovírus é detectado em suínos de terminação com infecção subclínica e sua prevalência é menor em leitões de maternidade, além disso não foi relacionado a sinais clínicos (WANG *et al.*, 2006). Já em humanos, RV e norovírus foram os agentes mais comuns detectados em co-infecções com diarreia aquosa (KOH *et al.*, 2008). Visto que este estudo envolve suínos e o norovírus foi detectado em somente 2 amostras, é provável que ele não esteja interferindo nos sinais clínicos ou lesões observadas no surto em que ele foi detectado.

O sapovírus foi detectado nos surtos 1 e 2, sendo que em uma amostra não houve detecção de RV por IHQ ou PCR. Este fato sugere que a infecção por sapovírus possa ocorrer após a infecção por RV, prolongando os sinais clínicos e intensificando as lesões.

Detecção simultânea de RV e sapovírus ocorreu em 4% das amostras de leitões de maternidade com diarreia no Japão (KATSUDA *et al.*, 2006).

Kobuvírus foi detectado em amostras dos surtos 2, 3 e 4, com maior frequência no último surto. O kobuvírus suíno pertence à família *Picornaviridae*, seu primeiro isolamento foi a partir de uma gastroenterite ocorrida em um humano (REUTER *et al.*, 2010). Associação entre esse vírus e diarreia em suínos tem sido encontrada, principalmente em leitões de maternidade (BARRY *et al.*, 2008). Contudo, até o presente momento não há estudos reproduzindo a doença e descrevendo as lesões em suínos (REUTER *et al.*, 2011), o que impede conclusões a respeito do papel desse vírus nos casos deste estudo.

5. FIGURAS ADICIONAIS



Figura 1. Maternidade do surto três, leitões apresentando diarreia amarelada, evidenciada pela presença de fezes líquidas no piso.



Figura 2. Suíno com conteúdo líquido no cólon (seta).

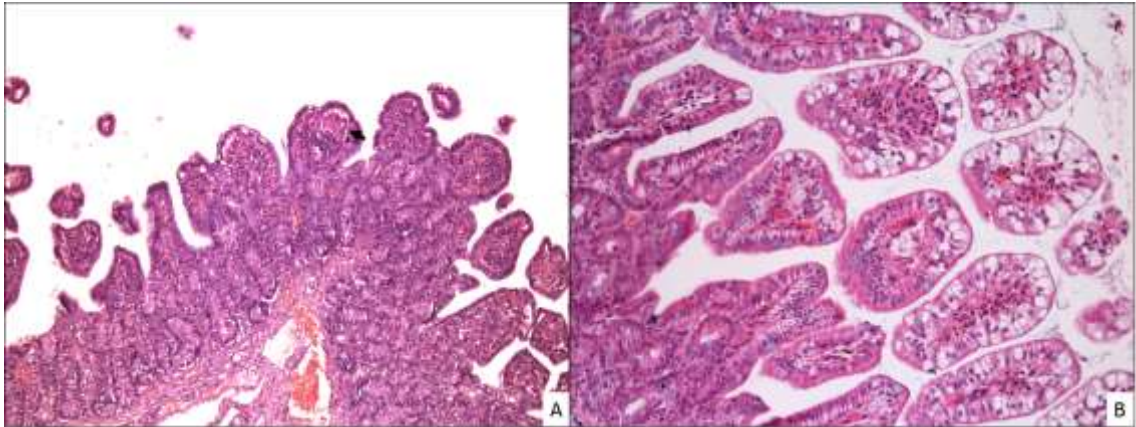


Figura 3. Secções histológicas de intestino delgado de suínos com infecção por RV. **A.** Vilosidade com debris celulares na lâmina própria (seta). HE, Obj. 10. **B.** Vacuolização dos enterócitos no ápice de vilosidades. HE, Obj. 20.

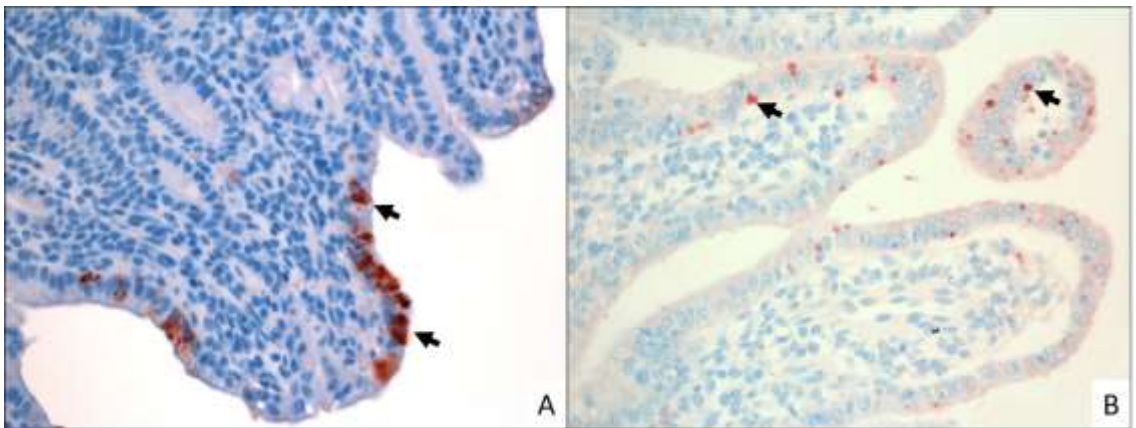


Figura 4. Secções histológicas de intestino delgado de suínos com infecção por RV. **A.** Secção intestinal positiva na IHQ para RV pertencente ao surto um. A marcação ocupa todo o citoplasma das células, na forma de grânulos (setas). **B.** Secção intestinal pertencente ao surto três, positiva na IHQ para RV. A marcação é observada próxima ao núcleo, em formato oval a circular (setas). AEC e Hematoxilina de Mayer, Obj. 40.

6. CONCLUSÕES

Este estudo descreveu detalhadamente com uma ampla investigação de surtos de infecção por RV em suínos de maternidade. Os achados patológicos de conteúdo líquido a pastoso no cólon e ceco, atrofia de vilosidades e vacuolização epitelial no intestino foram os mais frequentes, característicos de infecção por RV.

A imuno-histoquímica revelou-se uma ferramenta importante no diagnóstico de RV em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina. A partir dela foi possível evidenciar dois padrões distintos de marcação para RV.

Por meio da RT-PCR o RV do grupo C foi o mais frequentemente detectado, o que reforça sua importância na etiologia de diarreia em suínos jovens no sul do Brasil, fato que deve ser considerado no desenvolvimento de vacinas e técnicas de diagnóstico.

A detecção de outros vírus por RT-PCR revelou a presença desses agentes relativamente recentes em suínos de maternidade com RV no sul do Brasil. As associações de RV com sapovírus e kobuvírus requerem mais investigações e o uso de técnicas que possam detectar esses agentes nos tecidos afetados, como a IHQ, para serem melhor esclarecidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, M.U.; TANIGUCHI, K.; KOBAYASHI, N.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; ISLAM, M.; SHAIKH, H.; URASAWA, S. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay using subgroup- and serotype-specific monoclonal antibodies of human rotavirus obtained from diarrheic patients in Bangladesh. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 1678-1681, 1989.
- ALAM, M. M.; KOBAYASHI, N.; ISHINO, M.; AHMED, M. S.; AHMED, M. U.; PAUL, S. K.; MUZUMDAR, B. K.; HUSSAIN, Z.; WANG, Y.H.; NAIK, T. N. Genetic analysis of an ADRV-N-like novel rotavirus strain B219 detected in a sporadic case of adult diarrhea in Bangladesh. **Archives of Virology**, v. 152, n. 1, p. 199-208, 2007.
- ALFIERI A.A.; LEITE J.P.G.; ALFIERI A.; JIANG, B. ; GLASS, R.I.; GENTSCH, J. Detection of field isolates of human and animal group C rotavirus by reverse transcription–polymerase chain reaction and digoxigenin-labeled oligonucleotide probes. **Journal of Virological Methods**, v.83, n. 1-2, p. 35-43, 1999a.
- ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; BEUTEMMÜLLER, E.A.; BRITO, B.G.; MÉDICI, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.20, n.1, p. 5-11, 1999b.
- AMIMO, J.O.; VLASOVA, A.N.; SAIF, L.J. Prevalence and genetic heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. **Veterinary Microbiology**, v.164, n. 1-2, p. 27-38, 2013.
- BARRY A.F.; ALFIERI A.F.; ALFIERI A.A. Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the cowden strain of sapovirus genogroup III, in brazilian swine herds. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.1, p.82-86, 2008.
- BARTHASSON D.L.; BRITO, W.M.E.D.; SOBESTIANSKY, J.; CAIXETA, S.P.M.B.; MIRANDA, T.M.T.; SILVA, L.A. Ocorrência de infecção por parvovírus suíno e gastroenterite transmissível em suínos, criados de forma extensiva, em Goiás. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1227-1229, 2009.
- BENNET, R.; IJPELAAR, J. Updated estimates of the costs associated with thirty four endemic livestock diseases in great britain: a note. **Journal of Agricultural Economics** v. 56, n. 1, p. 135-144, 2005.
- BENFIELD D.A.; STOTZ I.; MOORE R.; MCADARAGH J.P. Shedding of rotavirus in feces of sows before and after farrowing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n.1, p.186-190, 1982.
- BOHL E.H.; THEIL, K.W.; SAIF, L.J. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 19, n. 2, p. 105-111, 1984.

- BOSHUIZEN J.A.; REIMERINK J.H.J.; KORTELAND-VAN MALE A.M.; VAN HAM, V.J.J.; KOOPMANS, M.P.G.; BÜLLER, H.A.; DEKKER, J. EINERHAND, A.W.C. Changes in small intestinal homeostasis, morphology, and gene expression during rotavirus infection of infant mice. **Journal of Virology**, v. 77, n. 24, p. 13005-13016, 2003.
- BRENTANO, L.; ZANELLA, J.R.C.; MORES, N.; PIFFER, I. A. 2002. Levantamento soroepidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus da influenza H3N2 e H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. Comunicado técnico, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia-SC, p.1-6.
- BROWN, C.C.; BAKER, D.C.; BARKER, I.K. Alimentary system. In: MAXIE, M.G. (ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 5 ed. vol. 2. Saunders Elsevier, Philadelphia, pp.135-279. 2006.
- CHEETHAM, S.; SOUZA, M.; MEULIA, T.; GRIMES, S.; HAN, M.G.; SAIF, L. Pathogenesis of a Genogroup II Human Norovirus in Gnotobiotic Pigs. **Journal of Virology**, v. 80, n. 21, p. 10372-10381, 2006.
- CIARLET, M.; CONNER, M.E.; FINEGOLD M.J.; ESTES, M.K. Group a rotavirus infection and age-dependent diarrheal disease in rats: a new animal model to study the pathophysiology of rotavirus infection. **Journal of Virology**, v. 76, n. 1, p. 41-57, 2002.
- CIARLET, M.; ESTES, M.K. Human and most animal rotavirus strains do not require the presence of sialic acid on the cell surface for efficient infectivity. **Journal of General Virology**, v. 80, n. 4, p. 943-948, 1999.
- CLARK, B.; MACKENDRICK, M. A review of viral gastroenteritis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 461-469, 2004.
- COLLINS, J.E.; BERGELAND M.E.; BOULEY, D.; DUCOMMUN, A.L.; FRANCIS, D.H.; YESKE, P. Diarrhea associated with *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in neonatal pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 1, n. 4, p. 351-353, 1989.
- COULSON, B.S.; UNICOMB, L.E.; PITSON, G. A.; BISHOP, R. F. Simple and specific enzyme immunoassay using monoclonal antibodies for serotyping human rotaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 509-515, 1987.
- CROUCH, C.F.; WOODE, G.N. Serial studies of virus multiplication and intestinal damage in gnotobiotic piglets infected with rotavirus. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 325-334, 1978.
- CRUZ-JUNIOR, E. C.; SALVARANI, F.M.; SILVA, R.O.S.; SILVA, M. X.; LOBATO, F.C.F.; GUEDES, R.M.C. A surveillance of enteropathogens in piglets from birth to seven days of age in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 963-969, 2013.

- CUCKOR, G.; BLACKLOW, N.R. Human viral gastroenteritis. **Microbiological Reviews**, v. 48, n. 2, p. 157-179, 1984.
- DENNEHY, P.H.; GAUNTLETT, D.R.; SPANGENBERGER, S.E. Choice of reference assay for the detection of rotavirus in fecal specimens: electron microscopy versus enzyme immunoassay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1280-1283, 1990.
- DEWEY, C.; CARMAN, S.; PASMA, T.; JOSEPHSON, G.; MCEWEN, B. Relationship between group A porcine rotavirus and management practices in swine herds in Ontario. *Canadian Veterinary Journal*, v. 44, n. 8, p. 649-653, 2003.
- EICHWALD, C.; ARNOLDI, F.; LAIMBACHER, A.S.; SCHRANER, E.M.; FRAEFEL, C.; WILD, P.; BURRONE, O.R.; ACKERMANN, M. Rotavirus viroplasm fusion and perinuclear localization are dynamic processes requiring stabilized microtubules. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, e47947, 2012.
- FAIRBROTHER, J.M.; NADEAU, E.; GYLES, C.L. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, v. 6, n. 1, p. 17-39, 2005.
- GALLEGOS, C.O.; PATTON, J.T. Characterization of rotavirus replication intermediates: a model for the assembly of single-shelled particles. **Virology**, v. 172, n. 2, p. 616-627, 1989.
- GATTI M.S.V.; FERRAZ, M.M.G.; RÁCZ, M.L. ; CASTRO, A.F.P. Rotavirus excretion in naturally infected pigs with and without diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, v. 37, n. 1-2, p. 187-190, 1993.
- GELBERG, H.B. Studies on the age resistance of swine to group A rotavirus infection. **Veterinary Pathology**, v. 29, n. 2, p. 161-168, 1992.
- GELBERG, H. B.; HALL, W. F.; WOODE, G. N.; BASGALL, E. J.; SCHERBA, G. Multinucleate enterocytes associated with experimental group a porcine rotavirus infection. **Veterinary Pathology**, v. 27, n. 6, p. 453-454, 1990.
- GELBERG, H.B.; WOODE, G.N.; KNIFFEN, T.S.; HARDY, M.; HALL, W.F. The shedding of group A rotavirus antigen in a newly established closed specific pathogen-free swine herd. **Veterinary Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 213-229, 1991.
- GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; GOUVEA, V.; GORZIGLIA, M.; FLORES, J.; DAS, B.K.; BHAN, M.K. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 6, p. 1365-1373, 1992.
- GOLDSMITH, C.S.; MILLER, S.E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 552-563, 2009.
- GOUVEA, V.; ALLEN, J.R.; GLASS, R.I.; FANG, Z. Y.; BREMONT, M.; COHEN, J.; McCRAE, M.A.; SAIF, L.J.; SINARACHATANANT, P.; CAUL, O. Detection of

- group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 519-523, 1991.
- GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 276-282, 1990.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotaviruses by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.5, p. 1333-1337, 1994a.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 5, p.1338-1340, 1994b.
- GRAHAM, D.Y.; SACKMAN, J.W.; ESTES, M.K. Pathogenesis of rotavirus-induced diarrhea: preliminary studies in miniature swine piglet. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 29, n. 11, p. 1028-1035, 1984.
- GREGORI, F.; ROSALES, C.A.R.; BRANDÃO, P.E.; SOARES, R.M.; JEREZ J.A. Diversity of porcine rotavirus genotypes in São Paulo State, Brazil **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 9, p. 707-712, 2009.
- GUO, M.; HAYES, J.; CHO, K.O.; PARWANI, A.V.; LUCAS, L.M.; SAIFF, L.J. Comparative pathogenesis of tissue culture-adapted and wild-type cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. **Journal of Virology**, v. 75, n. 19, p. 9239-9251, 2001.
- HALAIHEL, N.; LIÉVIN, V.; ALVARADO, F.; VASSEUR, M. Rotavirus infection impairs intestinal brush-border membrane Na⁺-solute cotransport activities in young rabbits. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 3, p. G587-G596, 2000.
- HALAIHEL, N.; MASÍA, R.M.; FERNÁNDEZ-JIMÉNEZ, M.; RIBES, J.M.; MONTAVA, R.; DE BLAS, I.; GIRONÉS, O.; ALONSO, J. L.; BUESA, J. Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 4, p. 542-548, 2010.
- HALL, G. A.; BRIDGER, J.C.; CHANDLER, R. L.; WOODE, G. N. Gnotobiotic piglets experimentally infected with neonatal calf diarrhoea reovirus-like agent (rotavirus). **Veterinary Pathology**, v. 13, n. 3, p. 197-210, 1976.
- HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K.; SNODGRASS, D.R.; MENZIES, J.D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.
- HODGINS, D.C.; KANG, S.Y.; DeARRIBA, L.; PARREÑO, V.; WARD, L.A.; YUAN, L.; TO, T.; L.J.SAIF. Effects of maternal antibodies on protection and development

- of antibody responses to human rotavirus in gnotobiotic pigs. **Journal of Virology**, v. 73, n. 1, p. 186-197, 1999.
- HOLMES, I.H.; RODGER, S.M.; SCHNAGL, R.D.; RUCK, B.J. Is lactase the receptor and uncoating enzyme for infantile enteritis (rota) viruses? **The Lancet**, v.1, n. 7974, p. 1387-1388, 1976.
- JANKE, B.H.; NELSON, J.K.; BENFIELD, D.A.; NELSON, E.A. Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 4, p. 308-311, 1990.
- JIANG, X.; HUANG, P.W.; ZHONG, W.M.; FARKAS, T.; CUBITT, D.W.; MATSON, D.O. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 83, n. 1-2, p. 145-154, 1990.
- JOHANSEN, M.; ALBA, L.; KJÆRSGARD, H.D.; BÆNKBO, P. Factors associated with suckling piglet average daily gain. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 63, n. 1-2, p. 91-102, 2004.
- KATSUDA, K.; KOHMOTO, M.; KAWASHIMA, K.; TSUNEMITSU, H. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** v. 18, n. 4, p. 350-354, 2006.
- KIM, H.J.; PARK, J.G.; MATTHIJNSSENS, J.; LEE, J.H.; BAE, Y.C.; ALFAJARO, M.M.; PARK, S.I.; KANG, M.I.; CHO, K.O. Intestinal and extra-intestinal pathogenicity of a bovine reassortant rotavirus in calves and piglets. **Veterinary Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 291-303, 2011.
- KIM, S.Y.; SONG, D.S.; PARK, B.K. Differential detection of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus by duplex RT-PCR. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 6, p. 516-520, 2001.
- KOBAYASHI, N.; NAIK, T. N.; KUSUHARA, Y.; KRISHNAN, T.; SEN, A.; BHATTACHARYA, S.K.; TANIGUCHI, K.; ALAM, M.; URASAWA, T.; URASAWA, S. **Journal of Medical Virology**, v. 64, n. 4, p. 583-588, 2001.
- KOH, H.; BAEK, S.Y.; SHIN, J.I.; CHUNG, K.S.; JEE, Y.M. Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 23, n. 6, p. 937-940, 2008.
- KORDASTI, S.; ISTRATE, C.; BANASAZ, M.; ROTTENBERG, M.; SJÖVALL, H.; LUNDGREN, O.; SVENSSON, L. Rotavirus infection is not associated with small intestinal fluid secretion in the adult mouse. **Journal of Virology**, v. 80, n. 22, p. 11355-11361, 2006.
- KUGA, K.; MIYAZAKI, A.; SUZUKI, T.; TAKAGI, M.; HATTORI, N.; KATSUDA, K.; MASE, M.; SUGIYAMA, M.; TSUNEMITSU, H. Genetic diversity and

- classification of the outer capsid glycoprotein VP7 of porcine group B rotaviruses. **Archives of Virology**, v. 154, n. 11, p. 1785–1795, 2009.
- KWEON, C.H.; LEE J.G.; HAN, M.G.; KANG, Y.B. Rapid diagnosis of porcine epidemic diarrhea virus infection by polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 59, n. 3, p. 231-232, 1997.
- LECCE, J.G.; BALSBAUGH, R.K.; CLARE, D.A.; KING, M.W. Rotavirus and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weanling diarrhea of pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 715-723, 1982.
- LESER, T.D.; AMENUVOR, J.Z.; JENSEN, T.K.; LINDECORONA, R.H.; BOYE, M.; MELLER, K. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 673-690, 2002.
- LIPPKE, R.T.; BOROWSKI, S.M.; MARQUES, S.M.T.; PAESI, S.O.; ALMEIDA, L.L.; MORENO, A.M.; ZLOTOWSKI, P.; CORBELLINI, L.G.; BARCELLOS, D.E.S.N. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 6, p. 505-510, 2011.
- LLOYD-EVANS, N.; SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces. **Journal of Hygiene**, v. 97, n. 1, p. 163-173, 1986.
- LOGAN, C.; O'LEARY, J.J.; O'SULLIVAN, N. Real-time reverse transcription-PCR for detection of rotavirus and adenovirus as causative agents of acute viral gastroenteritis in children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3189-3195, 2006.
- LÓPEZ, S.; ARIAS, C.F. Multistep entry of rotavirus into cells: a versaillesque dance. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 6, p. 271-278, 2004.
- LORENZETTI, E.; MEDEIROS, T.N.S.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Genetic heterogeneity of wild-type G4P [6] porcine rotavirus strains detected in a diarrhea outbreak in a regularly vaccinated pig herd. **Veterinary Microbiology**, v. 154, n. 1-2, p. 191-196, 2004.
- LORROT, M.; VASSEUR, M. How do the rotavirus NSP4 and bacterial enterotoxins lead differently to diarrhea? **Virology Journal**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2007.
- MATTHIJNSSENS, 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.; VAN RANST, M. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human wa-like and porcine rotavirus strains and human ds-1-like and bovine rotavirus strains. **Journal of Virology**, v. 82, n. 7, p. 3204–3219, 2008.
- MATHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for

- rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v. 157, n. 6, p. 1177–1182, 2012.
- MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; LORUSSO, E.; BELLACICCO, A. L.; DECARO, N.; CAMERO, M.; BOZZO, G.; MOSCHIDOU, P.; ARISTA, S.; PEZZOTTI, G.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, A. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. **Veterinary Microbiology**, v. 123, n. 1-3, p. 26-33, 2007.
- MARSHALL, J.A. The role of transmission electron microscopy in the study of gastroenteritis viruses. **Microbiology Australia**, v. 33, n. 2, p. 85-86, 2012.
- McNULTY M.S. Rotaviruses. **Journal of General Virology**, v. 40, n. 1, p. 1-18, 1978.
- MEDICI, K.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI A.F.; ALFIERI, A.A. VP6 gene diversity in Brazilian strains of porcine group C rotavirus. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 506-513, 2010.
- MEDICI, K.C.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified by polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Swine Health and Production**, v. 19, n. 3, p. 146-150, 2011.
- MORIN, M.; MAGAR, R.; ROBINSON, Y. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a quebec swine herd. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 3, p. 385-389, 1990.
- PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; BROWN, J.F.; McCRAE, M.A. Molecular characterization of rotaviruses with distinct group antigens. **Journal of General Virology**, v. 64, n. 10, p. 2093-2101, 1983.
- PESAVENTO, J.B.; CRAWFORD, S.E.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V.V. Rotavirus Proteins: Structure and Assembly. In: ROY, P (ed.). **Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis**. 1a. ed. Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg, pp. 190-211, 2006.
- RAMOS, A.P.; STEFANELLI, C.C.; LINHARES, R.E.; DE BRITO B.G.; SANTOS, N.; GOUVEA, V.; DE CASSIA LIMA, R.; NOZAWA, C. The stability of porcine rotavirus in feces. **Veterinary Microbiology** v. 71, n.1-2, p. 1-8, 2000.
- RAMIG, R.F. Pathogenesis of Intestinal and Systemic Rotavirus Infection. **Journal of Virology**, v. 78, n. 19, p. 10213-10220, 2004.
- REUTER, G.; BOROS, A.; PANKOVICS, P. Kobuviruses - a comprehensive review. **Reviews in Medical Virology**, v. 21, n.1, p. 32-41, 2011.
- REUTER, G.; KECSKEMÉTI, S.; PANKOVICS, P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 696-698, 2010.

- RODÁK, L.; SMÍTALOVÁ, R.; ŠMÍD, B.; NEVORÁNKOVÁ, Z.; VALÍČEK, L.; PŠIKAL, I. Comparing electron microscopy and a competitive blocking ELISA in the detection of rotaviruses in porcine faeces. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 279-281, 2011.
- SAIF, L.J.; FERNANDEZ, F.M. Group A rotavirus veterinary vaccines. **Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 1, p. 98-106, 1996.
- SAIF, L.J. *Reoviridae*. In: MACLACHLAN N.J.; DUBOVI, E.J. **Fenner's Veterinary Virology**, 4a. ed, Elsevier, Oxford, UK, p. 276-290, 2011.
- SALIM, A.F.; PHILLIPS, A.D.; WALKER-SMITH, J.A.; FARTHING, M.J. Sequential changes in small intestinal structure and function during rotavirus infection in neonatal rats. **Gut**, v. 36, n. 2, p. 231-238, 1995.
- SANEKATA, T.; KUWAMOTO, Y.; AKAMATSU, S.; SAKON, N.; OSETO, M.; TANIGUCHI, K.; NAKATA, S.; ESTES, M.K. Isolation of Group B Porcine Rotavirus in Cell Culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 759-761, 1996.
- SATO, K.; INABA, Y.; SHINOZAKI, T.; FUJII, R.; MATUMOTO, M. Isolation of human rotavirus in cell cultures: brief report. **Archives of Virology**, v. 69, n. 2, p. 155-160, 1981.
- SETTEMBRE, E.C.; CHEN, J.Z.; DORMITZER, P.R.; GRIGORIEFF, N.; HARRISON, S.C. Atomic model of an infectious rotavirus particle. **The EMBO Journal** v. 30, n. 2, p. 408-416, 2011.
- SHAW, R.D.; STONER-MA, D.L.; ESTES, M.K.; GREENBERG, H.B. Specific Enzyme-Linked Immunoassay for Rotavirus Serotypes 1 and 3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 286-291, 1985.
- SMÍTALOVA, R.; RODAK, L.; SMID, B.; PŠIKAL, I. Detection of nongroup A rotaviruses in faecal samples of pigs in the Czech Republic. **Veterinarni Medicina**, v. 54, n. 1, p. 12-18, 2009.
- SNODGRASS, D.R.; HERRING, A.J.; CAMPBELL, I.; INGLIS, J.M.; HARGREAVES, F.D. Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. **Journal of General Virology**, v. 65, n. 5, p. 909-914, 1984.
- SONGER, J.G.; GLOCK, R.D. Enteric infection of swine with *Clostridium perfringens* types A and C. **Swine Health and Production**, v. 6, n. 5, p. 223-225, 1998.
- SONGER, J.G.; UZAL, FA. Clostridial enteric infections in pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 528-536, 2005.
- SURENDRAN, S. Rotavirus infection: molecular changes and pathophysiology. **EXCLI Journal**, v. 7, n. 1, p. 154-162, 2008.

- THONGPRACHUM A, CHAIMONGKOL N, KHAMRIN P; PANTIP, C.; MIZUGUCHI, M.; USHIJIMA, H.; MANEEKARN, N. A novel multiplex RT-PCR for identification of VP6 subgroups of human and porcine rotaviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 168, n. 1-2, p. 191-196, 2010.
- TORRES-VEGA, M.A.; GONZÁLEZ, R.A.; DUARTE, M.; PONCET, D.; LÓPEZ, S.; ARIAS, C.F. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 3, p. 821–830, 2000.
- TZIPORI, S.; SMITH, M.; HALPIN C.; MAKIN, T.; KRAUTIL, F. Intestinal changes associated with rotavirus and enterotoxigenic Escherichia coli infection in calves. **Veterinary Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 35-43, 1983.
- TZIPORI, S.; UNICOMB, L.; BISHOP, R.; MONTENARO, J.; VAELIOJA, J.L.M. Studies on attenuation of rotavirus A comparison in piglets between virulent virus and its attenuated derivative. **Archives of Virology**, v. 109, n. 3-4, p. 197-205, 1989.
- VARSHNEY, K.C.; BRIDGER, J.C.; PARSONS, K.R.; COOK, R.; TEUCHER, J.; HALL, G.A. The Lesions of Rotavirus Infection in 1- and 10-day-old Gnotobiotic Calves. **Veterinary Pathology**, v. 32, n. 6, p. 619-627, 1995.
- WANG, Q.H.; HAN, M.G.; CHEETHAM, S.; SOUZA, M.; FUNK, J.A.; SAIF, L.J. Porcine noroviruses related to human noroviruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1874-1881, 2005.
- WANG, Q.H.; SOUZA, M.; FUNK, J.A.; ZHANG, W.; SAIF, L.J. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription- pcr and microwell hybridization assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 2057-2062, 2006.
- WAKUDA, M.; IDE, T.; SASAKI, J.; KOMOTO, S.; ISHII, J.; SANEKATA, T.; TANIGUCHI, K. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p. 1491-1493, 2011.
- WELCH, A.B.; TWIENHAUS, M.J. Cell culture studies of a neonatal calf diarrhea virus. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287–294, 1973.
- WIELER, L.H.; ILIEFF, A.; HERBST, W.; BAUER, C.; VIELER, E.; BAUERFEIND, R.; FAILING, K.; KLÖS, H.; WENGERT, D.; BALJER, G.; ZAHNER, H. Prevalence of enteropathogens in suckling and weaned piglets with diarrhoea in Southern Germany. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 48, n. 2, p. 151-159, 2001.
- WILL, L.A.; PAUL P.S.; PROESCHOLDT, T.A.; AKTAR, S. N; FLAMING, K. P.; JANKE, B. H.; SACKS, J.; LYOO, Y.S.; HILL, H.T.; HOFFMAN, L.J.; WU, L.L. Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 6, n. 4, p. 416-422, 1994.

- WITTUM, T.E.; DEWEY, C.E.; HURD, H.S.; DARGATZ, D.A.; HILL, G.W. Herd- and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 1 to 3 days of age. **Journal of Swine Health and Production**, v. 3, n. 3, p. 105-112, 1995.
- XU, A.; BELLAMY, R.; TAYLOR, J.A. Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 23, p. 6465-6474, 2000.
- ZLOTOWSKI, P.; CORRÊA, A.M.R.; BARCELLOS, D.E.S.N.; CRUZ, C.E.F.; ASANOME, W.; BARRY, A. F.; ALFIERI, A.A.; DRIEMEIER, D. Intestinal lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 313-318, 2008.
- YASMON, A.; HARAHAP, E.D.; DWIPOERWANTORO, P.G.; DEWI, B.E. Detection of human group A and C rotaviruses in pediatric patients with acute gastroenteritis by real time RT-PCR assay: a preliminary study. **Makara Kesehatan**, v. 14, n. 2, p. 65-69, 2010.