

## DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS EM FEZES DE CÃES DOMÉSTICOS ATENDIDOS EM CLÍNICAS VETERINÁRIAS DA CIDADE DE MANAUS-AM

Thiago Moreira da SILVA<sup>1</sup>  
Cristóvão Alves da COSTA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>2</sup>Orientador CSAS/INPA

### INTRODUÇÃO

A diarreia é uma doença causada por vários agentes etiológicos, sendo os virais os de maior relevância epidemiológica (Linhares 2000). Os rotavírus são reconhecidamente os agentes etiológicos virais mais importantes associados às doenças diarreicas agudas em humanos, acometendo também várias espécies de aves e mamíferos (Vranjac 2004), sendo estimado ser o causador de mais de 800.000 mil mortes anuais em crianças com idade inferior a cinco anos nos países em desenvolvimento (Carraro 2008).

Rotavírus canino é responsável por formas leves ou assintomáticas de enterites associadas com vômito, anorexia e emagrecimento principalmente em filhotes, sendo em menor importância clínica em cães adultos porque a maioria das infecções é assintomática (Pimentel e Costa 2010).

No Brasil, o primeiro rotavírus canino descrito foi detectado pela técnica imunoenzimática (ELISA) nas fezes diarreicas de um cão por Gabbay *et al.* (2003). Catroxo *et al.* (2005) isolou o rotavírus das fezes de dois cães com três meses de idade, em uma criação de cães, na cidade de Jundiá, São Paulo.

Ruiz *et al.* (2009), analisando nove amostras fecais de cães adultos assintomáticos que foram levados ao Centro de Controle de Zoonoses do município de Osasco-SP, isolaram o rotavírus pertencente ao grupo A de dois cães. Pimentel e Costa (2010) isolaram rotavírus do grupo A das fezes de um cão assintomático de um total de 32 amostras analisadas, provenientes de cães do CCZ do município de Manaus-AM. Os autores afirmam que os cães contaminados podem atuar como um reservatório e uma fonte de disseminação desse vírus, mantendo sua circulação no ambiente, podendo infectar outros animais susceptíveis, inclusive o homem.

Tem sido cada vez mais frequente o isolamento de cepas atípicas de rotavírus em humanos e cães, sugerindo transmissão interespecie ou rearranjo entre vírus humano e canino (Luchs *et al.* 2012). Assim, animais domésticos como cães e gatos tem sido alvo de intensas pesquisas sobre a ocorrência de rotavírus e o possível cruzamento de barreiras interespecie de transmissão (Pimentel 2006).

O objetivo deste trabalho foi detectar rotavírus nas fezes de cães domésticos atendidos em clínicas veterinárias do município de Manaus-AM através da caracterização do genoma viral por eletroforese em gel de poliacrilamida e, em caso de positividade comparar os sintomas apresentados pelos cães com os descritos na literatura.

### MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto de 2014 a abril de 2015 foram coletadas 80 amostras fecais de cães de ambos os sexos, raça e idade com quadro clínico de diarreia em clínicas veterinárias da cidade de Manaus – AM e registrou-se toda sintomatologia apresentada pelos cães.

As fezes foram colhidas em microtubos de 1,5 mL com auxílio de espátulas, seringas ou sondas e os mesmos foram identificados e transportados sob refrigeração ao Laboratório de Virologia e Imunologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram mantidas a -20 °C, até o momento de serem processadas para extração do RNA viral.

As fezes foram preparadas em suspensão a 10% em tampão Tris/HCl 0,1M com pH 7,3. Essa etapa tem por finalidade obter uma amostra livre dos elementos diversos presentes no material fecal, assim, obtém-se uma amostra dita clarificada. O sobrenadante (500µL) foi utilizado para a extração do RNA viral a ser analisado por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida – EGPA.

A extração do RNA viral foi realizada utilizando a técnica do fenol-clorofórmio, onde se adicionava 100µL de duodecil sulfato de sódio 10% (SDS) aos 500µL do sobrenadante (amostra clarificada) e incubou-se a 37 °C por 30 minutos em banho Maria. Em seguida adicionou-se 300µL de fenol e 300µL de clorofórmio, agitando-se bem a cada 5 minutos em um intervalo de 15 minutos, seguido de centrifugação a 3.500g por 15 minutos. Após centrifugação o sobrenadante era recolhido e depositado em microtubo contendo 10µL de NaCl 20% e, em seguida, era adicionado 1000µL de etanol e incubados por -20 °C por 18 horas.

Depois de incubados o material foi centrifugado a 13.000g por 20 minutos. Após centrifugação o etanol foi descartado e os tubos invertidos em papel para secagem do sedimento, que foi ressuspense com 30µL de solução dissociante para ácido nucleico sem uréia. Posteriormente, os tubos com material foram incubados a uma temperatura de 37 °C por 30 minutos segundo Laemmli (1970). Uma vez extraído, o RNA viral foi submetido á EGPA segundo metodologia padronizada por Costa *et al.* (1990).

Para a formação do gel na cuba de eletroforese vertical foram utilizadas duas placas de vidro. Após a montagem depositou-se no recipiente formado pelas duas placas a solução do gel inferior e após polimerização a solução do gel superior, onde o pente foi introduzido imediatamente para a formação dos canais das amostras.

Após a polimerização do gel superior a placa foi acoplada à cuba de eletroforese vertical. Adicionou-se o tampão de corrida Tris-Glicina 4x pH 8,3, o pente foi retirado e 10µL das amostras foram adicionadas aos canais formados. A cuba pronta foi então ligada a uma fonte de energia elétrica sendo ajustado a corrente em 20 mA. O tempo médio de corrida foi de 1h e 30 minutos.

Após a corrida o gel foi retirado da cuba. O gel superior foi destacado e desprezado e o inferior marcado no canto superior esquerdo, local de início das amostras e deslocado com auxílio de um filete de água da lâmina de vidro para dentro de um recipiente plástico. O gel foi lavado duas vezes com água bidestilada e após a segunda lavagem foi iniciado o processo de coloração propriamente dito pelo nitrato de prata 0,1% de acordo com Herring *et al.* (1982) com algumas modificações introduzidas por Costa *et al.* (1990).

O gel corado pelo nitrato de prata foi lido em um transluminador de luz branca.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 80 amostras fecais analisadas 100% apresentaram resultado negativo, uma vez que não foi observado o padrão de segmentos de RNA característico de positividade para rotavírus nos géis analisados (Figura 1 B).

Amostras positivas para rotavírus humano, com positividade confirmada por PCR, foram utilizadas como controle positivo, porém mostraram um padrão de bandas indeterminado, devido os 11 segmentos de RNA característicos do genoma viral não estarem totalmente visíveis. Isso provavelmente ocorreu pelo tempo que estas amostras foram armazenadas. Portanto, não foi possível comparar as amostras testadas com um controle positivo. Entretanto, 50% das amostras foram submetidas a um segundo método de diagnóstico por meio da imunocromatografia, confirmando a negatividade observada na EGPA (Figura 1-A).

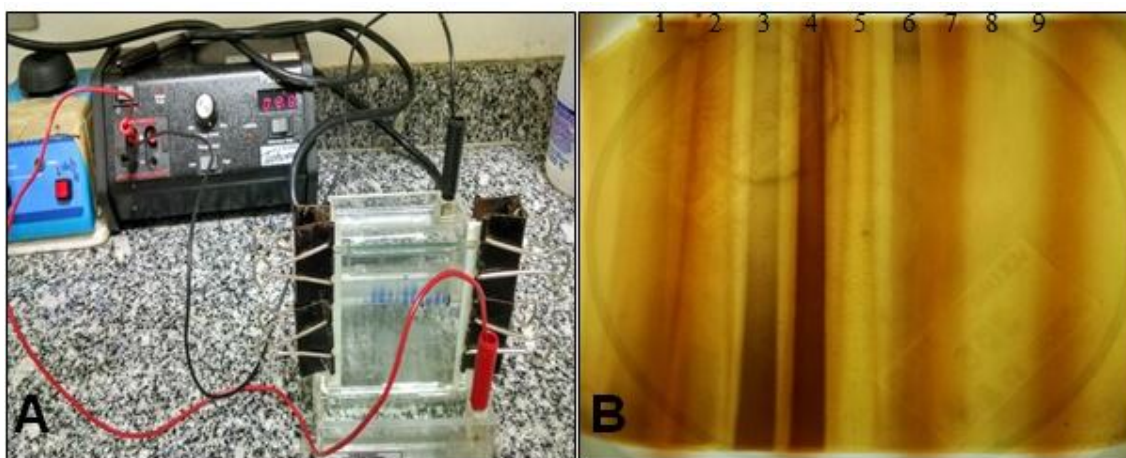


Figura 1. (A) EGPA com as amostras aplicadas no gel. (B) Gel de poliacrilamida após coloração por nitrato de prata. 1-9: amostras testadas com resultado negativo para rotavírus canino.

Quanto à sintomatologia apresentada pelos cães examinados (Fig. 2), não foi possível compará-las aos sintomas descritos na literatura para cães com rotavírus, visto que não se obteve positividade.

Ao contrário de Catroxo *et al.* (2005), Ruiz *et al.* (2009), que encontraram 22,22% de positividade e Pimentel e Costa (2010), que encontraram 3,12% de positividade, o trabalho obteve 0% de positividade para rotavírus, o que não corresponde aos trabalhos citados.

Igualmente ao resultado encontrado, Cecília (2010), coletou 202 amostras fecais diarreicas e não diarreicas provenientes de caninos (96/202, 47,5%), felinos (8/202, 4%) e galináceos (98/202, 48,5%) residentes na comunidade Quilombola do Abacatal, Ananindeua, Pará. Todas as amostras foram submetidas à imunocromatografia e EGPA para identificação de rotavírus, porém em ambas obteve-se 100% de negatividade.

Assim, a obtenção de 100% de negatividade nesta pesquisa para rotavírus pode ser uma indicação de que, para a população de cães estudada a frequência deste vírus seja de fato baixa o que é concordante com o relatado por Pimentel e Costa (2010), que apesar de terem isolado o rotavírus do grupo A em um cão, afirmam que a frequência deste vírus em cães é baixa no Brasil.

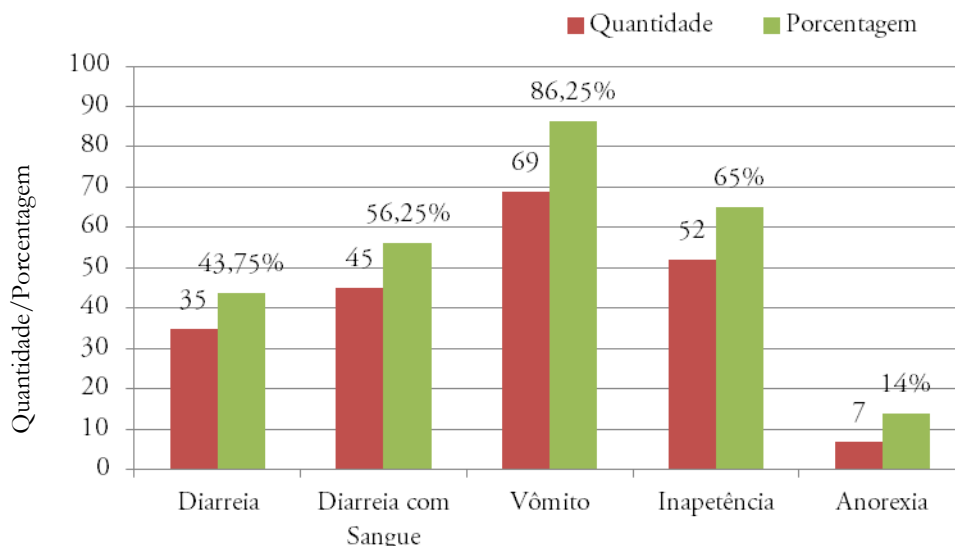


Figura 2. Sintomatologia apresentada pelos cães.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que não houve registro de caso positivo para rotavírus na população de animais estudados.

## REFERÊNCIAS

- Carraro, E. *et al.* 2008. Avaliação de 4 kits comerciais para detecção rápida de antígenos de rotavírus em amostras de fezes. *Revista brasileira de análises clínicas*, 40: 309-311.
- Catroxo, M.H.B.; Pongiluppi, T.; Gregori, F.; Bersano, J.G.; Ruiz, V.L.A.; Pretrella. 2005. Detecção de rotavírus pelas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão em fezes de cão com diarreia. *Arquivos do instituto biológico*, 72: 164.
- Costa, C.; Candeias, J.; Capeletti, E. 1990. Eletroferótipos de rotavírus em crianças com e sem quadros de gastroenterite. *Revista de Saúde Pública*, 24: 152-155.
- Gabbay, Y.B.; Homem, V.S.F.; Munford, V.; Alves, A.S.; Mascarenhas, J. 2003. Detecção de rotavírus em cachorros com diarreia. *Jornal brasileiro de microbiologia*, 34: 77-80.
- Herring, A.; Inglis, N.F.; Ojeh, C.K.; Snodgrass, D.R.; Menzies, J.D. 1982. Rapid diagnosis of rotavírus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrilamide gels. *Journal of Clinical Microbiology*, 16: 473-477.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Linhares, A. 2000. Epidemiologia das infecções por rotavírus no Brasil e os desafios para o seu controle. *Caderno de Saúde Pública*, 629 - 646.
- Luchs, A. *et al.* 2012. Rare G3P [3] rotavírus strain detected in Brazil Possible human – canine interspecies transmission. *Journal of Virology*. Adolfo Lutz Institute, virology center. Enteric diseases laboratory, São Paulo, SP, Brazil.

Matos, J.C. 2010. *Pesquisa de rotavírus e endoparasitos em animais na comunidade Quilombola do Abacatal, município de Ananindeua, Pará*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará.

Pimentel, R.B. 2006. *Rotavírus em cães: Uma nova preocupação em saúde pública*. Monografia, Centro Universitário do Norte, Manaus, Amazonas.

Pimentel, R.B.; Costa, C.A. 2010. Detecção de um cão doméstico com rotavírus na cidade de Manaus – AM. *Acta Amazonica*, 40: 405-408.

Ruiz, V.L.A.; Brandão, P.E.; Gregori, F.; Rodriguez, C.A.R.; Souza, S.L.P.; Jerez, J.A. 2009. Isolation of rotavírus from asymptomatic dogs in Brazil. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, 61: 996-999.

Vranjac, A. 2004. Diarréia e rotavírus (Revisão). *Revista Saúde Pública*, 38(6): 844-845.