



IDENTIFICAÇÃO DE PARTÍCULAS DE ROTAVÍRUS EM FEZES DE LEITÕES, DURANTE SURTO DE DIARREIA, UTILIZANDO A TÉCNICA DE CONTRASTAÇÃO NEGATIVA (PREPARO RÁPIDO) PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.

Edson Mora dos **Santos**¹; Marcia Helena Braga **Catroxo**²

Nº 21809

RESUMO – Os rotavírus são os principais agentes etiológicos de grave diarreia neonatal e do pós-desmame dos suínos, ocasionando altos índices de morbidade e mortalidade. São vírus RNA pertencentes à família Reoviridae e ao gênero Rotavírus. A rotavirose suína tem um importante impacto econômico na Indústria Suinícola, causando consideráveis prejuízos econômicos às granjas. Os suínos representam um reservatório potencial de transmissão zoonótica para os seres humanos. Este trabalho objetivou detectar a presença do rotavírus suíno em amostras de fezes de leitões provenientes de granjas do estado de São Paulo. Durante o mês de novembro de 2020 e março de 2021, foram colhidas 22 amostras de fezes de suínos, provenientes de granjas localizadas em Bragança Paulista, Vargem Grande Paulista e Pedra Bela, SP. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica para identificação do agente viral. Todas as 22 amostras foram processadas pela técnica de contração negativa (preparo rápido). Na técnica de contração negativa, as amostras foram suspensas em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0, colocadas em contato com grades metálicas, previamente cobertas com filme de colódio e carbono, drenadas com papel filtro e contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2%. Ao microscópio eletrônico de transmissão, foram observadas em 9 amostras, partículas típicas de rotavírus, não envelopadas, icosaédricas, caracterizadas como partículas “completas” e “vazias”, medindo em média 70 nm de diâmetro. A aplicação da técnica permitiu o rápido diagnóstico do agente viral propiciando a tomada imediata de medidas profiláticas e de controle da doença na granja.

Palavras-chaves: Rotavírus, Suíno, Microscopia Eletônica de Transmissão

1 Edson Moura dos Santos, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Ciências Biológicas, Anhembí Morumbi, São Paulo-SP; edson_moura01@outlook.com

2 Marcia Helena Braga Catroxo: Pesquisadora do Instituto Biológico, São Paulo-SP; marcia.braga@sp.gov.br



ABSTRACT – *Rotaviruses are the main etiological agents of severe neonatal and post-weaning diarrhea in pigs, causing high rates of morbidity and mortality. They are RNA viruses belonging to the Reoviridae family and the Rotavirus genus. Swine rotavirus has an important economic impact on the swine industry, causing considerable economic damage to farms. Pigs represent a potential reservoir of zoonotic transmission to humans. This work aimed to detect the presence of swine rotavirus in fecal samples from piglets from farms in the state of São Paulo. During November 2020 and March 2021, 22 swine feces samples were collected from farms located in Bragança Paulista, Vargem Grande Paulista and Pedra Bela, SP, Brazil. The samples were sent to the Electron Microscopy Laboratory for identification of the viral agent. All 22 samples were processed by the negative staining technique (rapid preparation). In the negative staining technique, the samples were suspended in 0.1M phosphate buffer and pH 7.0, placed in contact with metallic grids, previously covered with collodion and carbon film, drained with filter paper and negatively contrasted with ammonium molybdate 2%. Under the transmission electron microscope, typical non-enveloped, icosahedral particles of rotavirus were observed in 9 (40,9%), characterized as “complete” and “empty” particles, measuring an average of 70 nm in diameter. The application of the techniques allowed the rapid diagnosis of the viral agent, enabling immediate prophylactic and disease control measures to be taken on the farm.*

Keywords: Rotaviruses, Swines, Transmission electron microscopy

1. INTRODUÇÃO

Os rotavírus são importantes agentes etiológicos de grave diarreia neonatal em humanos e animais, incluindo, bovinos, suínos, equínos, caninos, felinos, galinhas e perus. A Organização Mundial de Saúde estima que 453.000 crianças com menos de 5 anos de idade, a maioria proveniente de países em desenvolvimento, foram a óbito por infecção com rotavírus, no ano de 2008, o que representa 5% da mortalidade infantil mundial (Tate et al., 2012).

Rotavírus é um gênero da família *Reoviridae*, cujo genoma possui 11 segmentos de RNA, codificando 6 proteínas estruturais (VP1-VP4, VP6 e VP7) e 5 não estruturais (NSp1-NSP5 /6). São classificados em 8 grupos (A-H) baseado na relação antigênica de sua proteína VP6 (Matthijnssens et al., 2012). Os grupos mais comuns que infectam humanos e animais são os A, B e C. O grupo A



é o mais frequentemente detectado em leitões com diarreia de 1 a 8 semanas de idade (Saif et al., 1994).

Foi primeiramente descrito como causa de diarreia em bezerros em 1969 (Mebus et al., 1969) e posteriormente em outras espécies animais, incluindo suínos, em 1976 (Woode et al., 1976).

O rotavírus suíno tem distribuição mundial tendo já sido relatado em vários países do mundo, como, África (Amino et al., 2015), Vietnam (Anh et al., 2014), Inglaterra (Bostock et al., 2014), México e Canadá (Marthaler et al., 2014), Itália (Monini et al., 2014) e Brasil (Pereira et al., 1994; Barbosa et al., 2013; Molinari et al., 2014).

Pesquisa realizada no Brasil em vários municípios do Estado de São Paulo, mostrou que 29,86% de 43 amostras examinadas de suínos com diarreia, eram positivas para partículas de rotavírus (Gregori et al., 2009).

O vírus causa uma infecção altamente contagiosa, caracterizada por vômitos, anorexia, prostração, diarreia de consistência pastosa à líquida de cor variável que perdura por 2 a 5 dias e desidratação. São extremamente resistentes às condições do meio ambiente, podendo permanecer infectante nas instalações, sendo disseminados rapidamente entre a população suína, conferindo dessa forma, um caráter endêmico à infecção (Pensaert, 1984; Alfieri et al., 2012).

A doença pode acometer leitões desde a primeira até a sexta semana de vida, mas ocorre com maior prevalência entre os animais de 2 a 4 semanas.

A infecção nos neonatos está associada à falha na imunidade passiva, devido à ingestão insuficiente de colostro ou pela ocorrência de um genótipo diferente daquele que ocorre endemicamente no rebanho (Alfieri et al., 2012).

O vírus se replica principalmente no intestino delgado, sendo transmitido pela rota oral-fecal (Debouck & Pensaert, 1983).

Os rotavírus infectam os enterócitos das porções apical e intermediária das vilosidades intestinais, provocando a lise dos enterócitos com diminuição da capacidade de absorção e das funções digestivas (Theil et al., 1978; Graham et al., 1984; Estes, 1990).

A rotavirose suína tem um importante impacto na indústria suinícola, causando prejuízos econômicos às granjas, devido as perdas no ganho de peso dos animais recuperados, custos com tratamentos e medicamentos, alta taxa de morbidade e de mortalidade, além da desuniformização dos lotes ao desmame (Paul & Stevenson, 1999; Chang et al., 2012).

Numerosos relatos tem descrito a transmissão inter-espécies de rotavírus humanos oriundos de diferentes espécies animais (Fredj et al., 2013; Doane et al., 1987; Luchs et al., 2012; Mukherjee et al., 2013; Papp et al., 2013).

A técnica de microscopia eletrônica é preconizada pela OIE para a realização do diagnóstico rápido de rotavírus suíno (Pensaert, 1984).

1.1. Tabelas, Figuras e Equações

1.1.1. Tabelas

Tabela 1. Descrição de amostras enviadas para diagnóstico de Rotavírus, de acordo com número de amostras, idade dos animais, localidade, data de envio, tipo de amostra e técnica utilizada.

Nº de Amostras	Idade Leitões	Local	Data	Material	Resultado
					Contrastação Negativa
7	20 dias	Bragança Paulista, SP	26/11/2020	Fezes	Positivo
2	20 dias	Vargem Grande Paulista, SP	26/11/2020	Fezes	Positivo
10	7-9 dias	Bragança Paulista, SP	23/04/2021	Fezes	Negativo
3	15 dias	Pedra Bela, SP	23/04/2021	Fezes	Negativo

1.1.2. Figuras



Figura 1. Amostras de fezes de coloração amarelada a esbranquiçada.

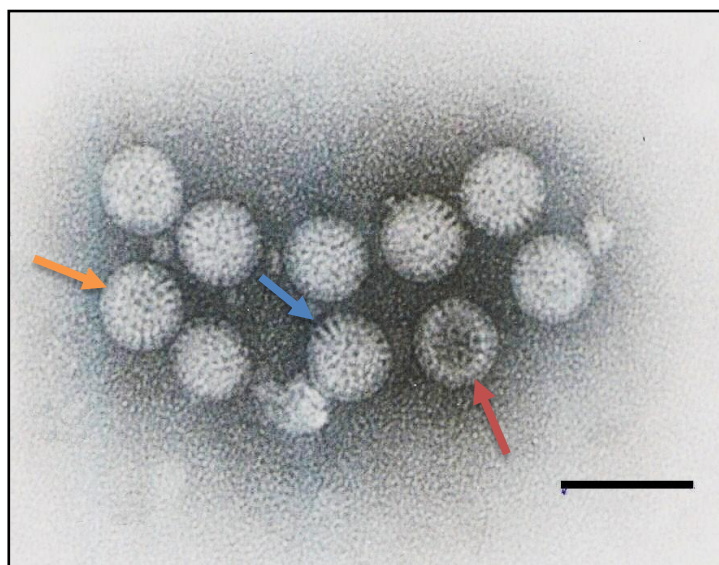


Figura 2. Rotavírus em fezes de suínos contrastado com molibdato de amônio 2% pela técnica de coloração negativa, mostrando partículas completas (seta laranja) e vazias (seta vermelha) e capsômeros individualizados (seta azul). Barra: 110 nm.

2. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Materiais

Durante os meses de novembro de 2020 e abril de 2021, foram encaminhadas ao laboratório de microscopia eletrônica do Instituto Biológico, para diagnóstico de agentes virais, cerca de 22 amostras de fezes de leitões, com idade variando entre 7 e 20 dias. Os animais apresentavam diarreia aquosa a pastosa, de coloração esbranquiçada a amarelada, além de vômitos, anorexia, prostração e desidratação e eram provenientes de granjas, localizadas em Bragança Paulista, Vargem Grande Paulista e Pedra Bela, São Paulo, SP. Não houve óbitos e os



animais reuperaram-se após 7 a 10 dias. Todas as 22 amostras foram processadas pela técnica de contração negativa (preparo rápido).

5.2 Métodos

5.2.1 Técnica de Contrastação Negativa:

Nesta técnica as amostras são suspensas em tampão fosfato 0,1M e pH 7,0, colocadas em contato com grades metálicas, previamente cobertas com filme de colódio e carbono, drenadas com papel filtro, contrastadas negativamente com molibdato de amônio a 2% e pH 5,0 sendo observadas ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 208 ((Brenner & Horne, 1959; Hayat & Miller, 1990; Madeley, 1997).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante os meses de novembro de 2020 e março de 2021, foram enviadas ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Biológico, 22 amostras fecais de leitões, provenientes de granjas localizadas respectivamente em Bragança Paulista, Vargem Grande Paulista e Pedra Bela, SP. Todas as 22 amostras foram processadas pela técnica de contração negativa (preparo rápido) e examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão. Destas 22 amostras, 9 (40,9%) foram positivas para partículas de rotavírus.

Os animais de nossa pesquisa, acometidos por diarreia, apresentavam idade variando entre 7 a 15 dias. Estes resultados foram também descritos em outros estudos sobre a presença de rotavírus em suínos (Qiao et al., 2009; Alfieri et al., 2012; Catroxo et al., 2012; Ruiz et al., 2016; Catroxo & Martins, 2018).

Os sintomas que os leitões apresentaram, caracterizados por vômitos, anorexia, prostração, diarreia e desidratação são condizentes com os achados na literatura sobre rotavirose suína (Pensaert, 1984; Alfieri et al., 2012; Ruiz et al., 2016).

As amostras fecais dos leitões de nosso estudo apresentavam coloração que variava de esbranquiçada a amarelada (**figura 1**), de consistência aquosa a pastosa, que persistia entre 2 a 5 dias, sendo que estes dados já foram comentados por outros autores (Qiao et al., 2009; Alfieri et al., 2012; Catroxo et al., 2012; Ruiz et al., 2016; Catroxo & Martins, 2018).



Após exame ao microscópio eletrônico de transmissão, verificamos que 9 (40,9%) das amostras de fezes processadas pela técnica de contrastação negativa eram positivas para partículas de rotavírus.

As partículas virais apresentavam o padrão típico de rotavírus (**figura 2**), sendo arredondadas, não envelopadas, icosaédricas, caracterizadas como partículas “completas” (**figura 2, seta laranja**) e “vazias”, (**figura 2, seta vermelha**), medindo em média 70 nm de diâmetro, mostrando capsômeros bem individualizados (**figura 2, seta azul**).

Partículas típicas de rotavírus, com estas mesmas características morfológicas foram identificadas por microscopia eletrônica de transmissão em amostras de fezes de leitões, durante surtos de diarreia, em outros estudos de rotavírus suínos, conduzidos por outros autores (Bohl et al., 1982; Chueh et al., 1982; Smitalova et al., 2006; 2009; Qiao et al., 2009; Alfieri et al., 2012; Catroxo et al., 2012; Ruiz et al., 2016; Catroxo & Martins, 2018).

Considerando-se que a diarreia em leitões nas fases de creche e de maternidade constituem um dos principais problemas sanitários na criação de suínos e apontada como um dos gargalos da suinocultura à medida que apresenta altas taxas de morbidade, letalidade variável com prejuízos produtivos e econômicos (Alfieri et al., 2012), destaca-se a importância do desenvolvimento de técnicas rápidas e seguras para a identificação dos vírus, que permitam implementar medidas efetivas de controle e de profilaxia da doença, colocando em pauta o uso de vacinas para erradicar esta doença.

A utilização da técnica de contrastação negativa (preparo rápido), permitiu capturar imagens fotográficas com maior foco, possibilitando visualizar com precisão e suavidade os capsômeros individualizados que caracterizam a morfologia dos rotavírus, podendo ser amplamente utilizada na pesquisa de partículas de rotavírus em diferentes tipos de amostras e em várias espécies animais.

De acordo com Zhang et al. (2013), as técnicas de microscopia eletrônica de transmissão, apresentam diversas vantagens tecnológicas, sendo uma ferramenta fundamental no diagnóstico clínico, permitindo a detecção precisa de todas as partículas virais, possibilitando um diagnóstico rápido em amostras de diferentes espécimes.

4. CONCLUSÃO

A técnica utilizada mostrou-se eficiente para o diagnóstico rápido do rotavírus, favorecendo a implementação de medidas profiláticas e de controle da doença nas granjas acometidas pelos surtos.



5. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida.

6. REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.A.; LORENZETTI, E. & ALFIERI, A.F. Rotavírose neonatal do pós-desmame em suínos. NFT Alliance., 2012. Disponível em: <http://www.nftalliance.com.br/artigos/suinos/rotavirose-neonatal-e-do-pos-esmame-em-suinos>. Acesso em: 06 jun. 2021.
- AMIMO, O.; JUNGA, J.O.; OGARA, W.O.; VLASOVA, A.N.; NJAHIRA, M.N.; MAINA, S.; OKOTH, E.A.; BISHOP, R.P.; L.J. SAIF, L.J. & DJIKENG, A. Detection and genetic characterization of porcine group A rotaviruses in asymptomatic pigs in smallholder farms in East Africa: Predominance of P[8] genotype resembling human strains. **Vet. Microbiol.**, 175:195-210, 2015.
- ANH, P.; CARRIQUE-Mas, J.J.; CUONG, N.V.; HO, N.T.; ANH, N.L.; DUY, D.T.; HIEN, V.B.; MYA, P.V.T.; RABAA, M.A.; FARRAR, J.; BAKER, S.; BRYANT, J.E. The prevalence and genetic diversity of group A rotaviruses on pig farms in the Mekong Delta region of Vietnam. **Vet. Microbiol.**, 160:258-65, 2014.
- BARBOSA, B.R.P.; CACCIATORI, N.T.; BERNARDES, G.; BESERRA, L.A.R. & GREGORI, F. Molecular Characterization of the Porcine Group A Rotavirus NSP2 and NSP5/6 Genes from São Paulo State, Brazil, in 2011/12. **Sci. World J.**, Article ID 241686, 7 pages, 2013.
- BOHL, E.H.; SAIF, L.J.; THEIL, K.W.; AGNES, A.G.; & CROSS, R.F. Porcine Pararotavirus: Detection, Differentiation from Rotavirus, and Pathogenesis in Gnotobiotic Pigs. **J. Clin. Microbiol.**, 15(2): 312-9, 1982.
- BRENNER, S. & HORNE, R. W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. **Biochem. Biophys. Acta.** 34:103, 1959.
- CATROXO, M.H.B.; BERSANO, J.G.; MARTINS, A.M.C.R.P.F.; OGATA, R.A.; SOUZA, F. & NASTARI, B.D.B. Detection of Rotavirus During Diarrhea Outbreak Occurred in Swine Farm, in Brazil by Transmission Electron Microscopy Techniques. In: Simpósio Sul Brasileiro de Microscopia e Microanálise (SSBMM), 06 a 09 de novembro de 2012, Maringá, Paraná.
- CATROXO, M.H.B. & MARTINS, A.M.C.R.P.F. Application of transmission electron microscopy techniques in the veterinary diagnosis of viral gastroenteritis in livestock animals. In: Jianyuan Chai, editor. Stomach Disorders. Chap. 6. Rijeka, Croatia: In-Tech; 2018. P. 77-112.
- CHANDLER-BOSTOCK, R.; HANCOX, L.R.; NAWAZ, S.; WATTS, O.; ITURRIZA-GOMARA, M. & MELLITS, K.H. Genetic diversity of porcine group A rotavirus strains in the UK. **Vet Microbiol.**, 17:173(1-2):27-37, 2014.
- CHANG, K.; KIM, Y. & SAIF, L.J. Rotavirus and reovirus. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. **Diseases of Swine**. 10. Wiley-Blackwell; West Sussex, UK: 2012. pp. 621–634.
- CHUEH, L.-L.; CHU, R.; LI, W.-i. & CHANG, W.F. Isolation and identification of swine rotavirus in Taiwan. **Chin. J. Microbiol. Immunol.**, 15(3):212-20, 1982.
- DEBOUCK, P. & PENSART, M. Rotavirus excretion in suckling pigs followed under field circumstances. **Annales de Recherches Veterinaires** 14:447–8, 1983.



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021

01 a 02 de setembro de 2021

ISBN 978-65-994972-0-9

DOANE, F.W. & ANDERSON, M. *Electron microscopy in diagnostic virology – A practical guide and atlas*. Cambridge, Cambridge University Press, 1987.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, editors. **Fields virology**. New York7 Raven Press; 1990. p. 1329–52.

FREDJ, M.B.H.; HEYLEN, E.; ZELLER, M.; FODHA, I.; BENHAMIDA-REBAI, M.; VAN RANST, M.; MATTHIJNSSENS, J.; TRABELSI, A. Feline origin of rotavirus strain, Tunisia, 2008. **Emerg. Infect. Dis.**, 19:630–4, 2013.

GRAHAM, D.Y.; SACKMAN, J.W. & ESTES, M.K. Pathogenesis of rotavirus induced diarrhea — preliminary studies in miniature swine piglet. **Diag. Dis. Sci.**, 29:1028–35.

GREGORI, F.; ROSALES, C.A.R.; BRANDÃO, P.E.; SOARES, R.M. & JEREZ, J.A. Diversidade genotípica de rotavírus suínos no Estado de São Paulo. **Pesq. Vet. Bras.** 29(9):707-712, setembro 2009.

HAYAT, M. A.; MILLER, S. E. 1990. Negative Staining. Mc. **Graw-Hill Publ.** Company. 253 p.

KATZ, D. & KOHN, A. Immunosorbent Electron Microscopy for Detection of Viruses. **Adv. Virus Res.**, 29:169-94, 1984.

KNUTTON, S. Electron microscopical methods in adhesion. **Meth. Enzymol.**, 253:145-58, 1995.

LUCHS, A.; CILLI, A.; MORILLO, S.G.; CARMONA, R.C & Timenetsky, M.C. Rare G3P[3] rotavirus strain detected in Brazil: possible human-canine interspecies transmission. **J. Clin. Virol.**, 54:89–92, 2012.

MADELEY, C. R. Electron microscopy and virus diagnosis. **J. Clin. Pathol.**, 50:454-456, 1997.

MATTHIJNSSENS, J., NAKAGOMI, O., KIRKWOOD, C.D., CIARLET, M., DESSELBERGER, U., VAN RANST, M. Group A rotavirus universal mass vaccination: how and to what extent will selective pressure influence prevalence of rotavirus genotypes? **Expert Review of Vaccines** 11(11):1347–1354, 2012.

MARTHALER, D.; HOMWONG, N.; ROSSOW, K.; CULHANE, M.; GOYAL, S.; COLLINS, J.; MATTHIJNSSENS, J. & CIARLET, M. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. **J. Virol. Methods.**, 209:30–34, 2014.

MEBUS, C.A.; UNDERDAHS, N. R.; RHODES, M. B. & TWIEHAUS, M. J. Calf diarrhea (scours) reproduced with a virus from a field outbreak. University of Nebraska Research Bulletin 233, 1-6. **Agric. Exp. Stat. Res. Bull.**, 233, 1969.

MOLINARI, B.L.D.; LORENZETTI, E.; OTONEI, R.A.A.; ALFIERI, A.F. & ALFIERI, A.A. Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. **Emerg. Infect. Dis.**, 20(6): 1019-1022, 2014.

MONINI, M.; ZACCARIA, G.; IANIRO, G.; LAVAZZA, A.; VACCARI, G. & RUGGERI, F.M. Full-length genomic analysis of porcine rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in Northern Italy. **Infect. Genet. Evol.**, 25:4-13, 2014.

MUKHERJEE, A.; MULLICK, S.; DEB, A.K.; PANDA, S. & CHAWLA-SARKAR, M. First report of human rotavirus G8P[4] gastroenteritis in India: evidence of ruminants-to-human zoonotic transmission. **J. Med. Virol.**, 85:537–45, 2013.

PAPP, H.; BORZAK, R.; FARKAS, S.; KISFALI, P.; LENGYEL, G.; MOLNAR, P.; MELEGH, B.; MATTHIJNSSENS, J.; JAKAB, F.; MARTELLA, V. & BANYAI, K. Zoonotic transmission of reassortant porcine



15º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2021

01 a 02 de setembro de 2021

ISBN 978-65-994972-0-9

G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15year period. **Infect. Genet. Evol.**, 19C:71–80, 2013.

PAUL, P. & STEVENSON, P. Rotavirus and Reovirus. In: Straw, B.; D'ALLAIRE; MENGELING, W., TAYLOR, D. (eds) **Diseases of Swine**. Iowa State University Press, Ames, 1999. pp 255–75.

PENSAERT, M.B. Viral gastroenteritis in suckling pigs. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.**, 1984, 3 (4), 809-18. (OIE).

PEREIRA, H. G.; LINHARES, A. C.; CANDEIRAS, J. A. N. & GLASS, R. I. Vigilancia de los virus de la gastroenteritis en los laboratorios nacionales del Brasil. **Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 116, p. 27-36, 1994.

QIAO, X.; Li, G.; WANG, X.; LI, X.; LIU, M. & LI, Y. Recombinant porcine rotavirus VP4 and VP4LTB expressed in *Lactobacillus casei* induced mucosal and systemic antibody responses in mice. **BMC Microbiol.**, 9(249):1-11, 2009.

RUIZ, V.L.A.; BERSANO, J.G.; CARVALHO, A.F.; CATROXO, M.H.B.; CHIEBAO, D.P.; GREGORI, F.; MIYASHIRO, S.; NASSAR, A.F.C.; OLIVEIRA, T.M.F.S.; OGATA, R.A.; SCARCELLI, E.P. & TONIETTI, P.O. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. **BMC Research Notes**, 9(22):1-7, 2016.

SAIF, L.J. & JIANG, B. Nongroup A rotaviruses of humans and animals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 185, 339–71, 1994.

SMITALOVA, R.; L. RODAK, L. & SMID, P.B. Isolation, immunochemical demonstration of field strains of porcine group A rotaviruses and electrophoretic analysis of RNA segments of group A and C rotaviruses. **Veterinarni Medicina**, 51(5): 288–95, 2006.

SMITALOVA, R.; RODAK, L.; SMID, B. & PSIKAL, I. Detection of nongroup A rotaviruses in faecal samples of pigs in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, 54(1): 12–8, 2009.

TATE, J.E.; BURTON, A.H.; BOSCHI-PINTO, C.; STEELE, A.D.; DUQUE, J. & PARASHAR, U.D. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programs: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Infect. Dis.**, 12:136–41, 2012.

THEIL, K.W.; BOHL, E.H.; CROSS, R.F.; KOHLER, E.M. & AGNES, A.G. Pathogenesis of porcine rotaviral infection in experimentally inoculated gnotobiotic pigs. **Am J Vet Res.**, 39:213– 20, 1978.

WOODE, G.N.; BRIDGER, J.; HALL, G.A.; JONES, J.M. & JACKSON G. The isolation of reovirus-like agents (rotaviruses) from acute gastroenteritis of piglets. **J. Med. Microbiol.**, 9:203–9.,1976.

ZHANG, Y., HUNG, T., SONG, J.D. & HE, J.S. (2013). Electron microscopy: Essentials for viral structure, morphogenesis and rapid diagnosis. **Science China Life Science Journal**, 56:421-430.