

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

OCORRÊNCIA DOS GENÓTIPOS G E P DE ROTAVÍRUS DO GRUPO A EM BEZERROS DE REBANHOS DE CORTE NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

M.G. Buzinaro¹, S.I. Samara¹, E.A.S. Pereira^{2*}, D.B. Fuentes^{1**}, M.C.S. Oliveira²

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/nº, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: glorinha@fcav.unesp.br

RESUMO

Foi determinada a ocorrência de rotavírus do grupo A e a caracterização molecular G e P de estirpes detectadas em bezerros de rebanhos de corte em propriedades rurais do Estado de São Paulo, Brasil. Foram analisadas amostras de fezes de 649 bezerros de 14 rebanhos de corte com idade entre 1 e 60 dias, independentemente da manifestação clínica de diarreia, colhidas de julho de 2003 a julho de 2004. Por meio das técnicas de ELISA e de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), determinou-se a ocorrência de rotavírus do grupo A em 64,3% (09/14) dos rebanhos e em 6,2% (40/649) dos animais. A maior frequência de infecção foi detectada em animais com idade entre 16 e 30 dias (10,5%). Foram diagnosticados bezerros infectados por rotavírus tanto em animais com sinais clínicos de diarreia (25,8%; 22/85) quanto naqueles assintomáticos (3,2%; 18/564), existindo, porém, uma correlação entre a presença da infecção e a manifestação clínica da diarreia ($p < 0,01$). A análise do perfil do genoma do rotavírus por PAGE identificou sete eletroferótipos distintos, indicando grande diversidade genômica dos rotavírus na região estudada. A genotipagem pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) das amostras de rotavírus revelou que as estirpes circulantes nos rebanhos eram G6P[5], G6P[11], G6P[5]P[11] e G10P[11].

PALAVRAS-CHAVE: Rotavírus, bovino, diarreia, RT-PCR, genótipos P, genótipos G.

ABSTRACT

OCCURRENCE OF THE GENOTYPES G AND P OF GROUP A ROTAVIRUS IN CALVES IN BEEF HERDS IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL. The frequency of group A rotavirus and the molecular G and P characterization of strains in beef cattle were determined from July 2003 to July 2004, in herds of the state of São Paulo, Brazil. Samples came from 649 calves, aged between 1 and 60 days, from 14 beef cattle herds, regardless of clinical manifestation of diarrhea. A 64.3% (9/14) frequency of rotavirus among herds and 6.2% (40/649) among animals were detected by ELISA and polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The higher frequency infection was detected in animals aged between 16 and 30 days (10.5%). Rotavirus infection was diagnosed in animals with (25.8%; 22/85) or without (3.2%; 18/564) clinical signs of diarrhea. A correlation was found between the presence of infection and the clinical manifestation of diarrhea ($p < 0.05$). PAGE analysis of the rotavirus's genome profile identified 7 distinct electropherotypes which indicated extensive genomic diversity of the rotavirus in the region under analysis. Genotyping by polymerase chain reaction (RT-PCR) of the rotavirus strains revealed the genotypes G6P[5], G6P[11], G6P[5]P[11] and G10P[11].

KEY WORDS: Rotavirus, cattle, diarrhea, RT-PCR, genotypes P, genotypes G.

Rotavírus é um dos principais agentes etiológicos associados à diarreia em animais jovens e crianças (BRIDGER, 1987). A rotavirose bovina ocorre principalmente na primeira e segunda semanas de vida resultando em perdas econômicas significativas à pecuária

bovina no mundo todo (SNODGRASS *et al.*, 1986; KLINGENBERG; SVENSSON, 1998). Rotavírus são membros da família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*. O genoma é formado por RNA de fita dupla (dsRNA) e dividido em onze segmentos bem definidos, circundados por

²Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, Brasil.

*Bolsista de Iniciação Científica/Fapesp/FCAVJ/Unesp.

**Mestranda, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, FCAVJ/Unesp.

um triplo capsídeo protéico (ESTES; COHEN, 1989). As proteínas do capsídeo externo VP4 (codificada pelo segmento 4) e VP7 (codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9), que segregam independentemente, induzem a produção de anticorpos sorotipo-específicos e definem a base da classificação viral em sorotipos P (VP4) e G (VP7) (TANIGUCHI *et al.*, 1993). Em bovinos, os genótipos G mais prevalentes são G[6], G[10] e G[8], enquanto G[1], G[2], G[3], e G[11] são detectados esporadicamente (SNODGRASS *et al.*, 1990; BRUSSOW *et al.*, 1992; GOUVEA *et al.*, 1994a; HUSSEIN *et al.*, 1993; FUKAI *et al.*, 1999). Entre os genótipos P, P[1], P[5] e P[11] são os relatados em bovinos (GOUVEA *et al.*, 1994b; ISHIZAKI *et al.*, 1995; PARWANI *et al.*, 1993; SUZUKI *et al.*, 1993).

O uso de técnicas sorológicas como o ensaio imunoenzimático (BELLINZONI *et al.*, 1989) e métodos moleculares como a reação em cadeia da polimerase (GOUVEA *et al.*, 1990) têm permitido a determinação das características antigênicas e moleculares das estirpes de rotavírus, fornecendo importantes informações para o estabelecimento de ações epidemiológicas e também para o desenvolvimento e monitoramento das vacinas utilizadas na prevenção e no controle das diarreias neonatais.

Este estudo objetivou determinar a taxa de ocorrência e características de rotavírus em bezerros de rebanhos bovinos de corte do Estado de São Paulo.

O estudo foi desenvolvido em fazendas de criação de gado bovino de corte localizadas nos municípios de São Carlos, Sertãozinho, Santa Rita do Passa Quatro, Serra Azul, Arealva e Cristais Paulista, nas regiões centro-oeste e nordeste do Estado de São Paulo. Cada rebanho foi visitado uma única vez, sendo colhidas amostras de fezes de todos os bezerros machos e fêmeas, com idade entre 1 e 60 dias, que apresentavam ou não manifestação clínica de diarreia. Os rebanhos amostrados eram formados por animais das raças Nelore, Canchim, e cruzamentos como: Simental/Nelore, Nelore/Black Angus, Charolês/Canchim e Nelore/Canchim/Simental. Os rebanhos estudados adotavam como manejo reprodutivo o sistema de estação de monta. Os nascimentos eram concentrados no fim da estação seca e início das águas, ou seja, outubro a março, época de maior disponibilidade de alimentos.

Foram colhidas 649 amostras de fezes de bezerros com idades entre 1 e 60 dias, em 14 rebanhos de bovinos de corte nos Municípios de São Carlos (n = 7 rebanhos amostrados), Sertãozinho (n = 1), Santa Rita do Passa Quatro (n = 1), Luis Antonio (n = 1), Serra Azul (n = 1), Arealva (n = 1), Descalvado (n = 1) e Cristais Paulista (n = 1). Dentre as amostras colhidas, 85 pertenciam a animais com diarreia e 564 foram obtidas de animais clinicamente saudáveis. As amostras de fezes foram colhidas diretamente da ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos e mantidas em

caixa isotérmica refrigerada até a chegada no laboratório, sendo posteriormente mantidas em temperatura de -20° C. Antes da realização dos testes foram preparadas suspensões de fezes a 20% (p/v) em tampão tris/cálcio (0,1 M Tris/HCl; 1,5 mM CaCl₂ pH 7,3).

As amostras de fezes foram analisadas pelo ensaio imunoenzimático tipo duplo sanduíche, de acordo com PEREIRA *et al.* (1985), com o (kit) EI ERA (Fundação Oswaldo Cruz, Biomanguinhos, RJ) para detecção de rotavírus e adenovírus. As amostras também foram analisadas por PAGE, seguindo-se as recomendações de HERRING *et al.* (1982), com algumas modificações introduzidas por PEREIRA *et al.* (1983). Resumidamente, o dsRNA foi extraído da suspensão fecal com fenol/clorofórmio e aplicado em gel de poliácridamida a 7,5%, tampão de corrida tris/glicina (0,025M Tris; 0,109M Glicina pH 8,3) e conduzido a 10mA durante 2 horas. Para visualizar as bandas do dsRNA o gel de poliácridamida foi corado com nitrato de prata, de acordo com HERRING *et al.* (1982). A amostra era considerada positiva se demonstrasse a presença do rotavírus por uma ou ambas as técnicas.

Amostras fecais positivas para rotavírus no EI ERA e/ou PAGE foram submetidas à reação em cadeia pela polimerase pós-transcrição reversa RT-PCR seguida de reação de semi- (nested) PCR multiplex. O RNA foi extraído com TRIZOL Reagent (Gibco BRL) e clorofórmio (Merck), realizando-se ensaios independentes para cada um dos genótipos. A síntese de cDNA (DNA complementar) foi realizada por transcrição reversa utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Invitrogen-Life Technologies), seguida pela primeira amplificação do segmento do gene que codifica as proteínas VP7 e VP4, com os respectivos pares de primers *sense* e *antisense*. A segunda amplificação do DNA (semi-nested PCR) foi desenvolvida utilizando-se uma mistura de primers (primer mix). Para o genótipo P, o primer mix era formado pelos iniciadores p/NCDV, p/UK, p/B223, p/OSU, p/Gott e o primer *antisense* con2. Para o genótipo G, o primer mix era composto pelos iniciadores DT6, HT8, ET10, FT5, BT11 e o primer *sense* Beg9 (GOUVEA *et al.*, 1990; GENTSCH *et al.* 1992; GOUVEA *et al.*, 1994a e 1994b).

O produto final do semi-(nested) PCR foi analisado em gel de agarose 1,2% e corado com brometo de etídeo (0,5 mg/mL). O tamanho do segmento genômico amplificado foi o indicativo do tipo P ou G da estirpe testada, comparado às amostras padrão. Os géis de agarose foram documentados pelo sistema de análise e documentação de eletroforese EDAS 120 (KODAC).

Em todos os ensaios foram utilizadas amostras padrão NCDV-Lincoln (Nebraska calf diarrhea virus) G6P[1] e KK3 G10P[11] de rotavírus bovino, gentil-

mente cedidas pelo Prof. Dr. José Antonio Jerez, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal/USP, como controles positivos e água MilleQ estéril, como controle negativo.

A possibilidade de associação entre a presença de rotavírus, consistência das fezes e idade dos animais foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) (PEREIRA, 1985).

Dos 14 rebanhos amostrados, nove (64,3%) apresentaram bezerros com resultados positivos para rotavírus do grupo A pelas técnicas de EIE e/ou PAGE. Bezerros foram considerados como positivos para rotavírose quando amostras de fezes continham partículas virais detectadas por qualquer uma das técnicas (EIE ou PAGE). A ocorrência de rotavírus entre os animais amostrados foi de 6,2% (40/649), com a presença de bezerros positivos tanto entre animais apresentando diarreia (25,8%; 22/85), quanto entre os bezerros assintomáticos (3,2%; 18/564) (Tabela 1). Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística e os valores mostraram que existe associação entre a presença de rotavírus e a consistência das fezes ($\chi^2 = 61,89$, $p < 0,01$). Bezerros na faixa etária de 16 a 30 dias apresentaram maior frequência de infecção por rotavírus (10,5%), diferindo significativamente da faixa de 31 a 45 dias ($\chi^2 = 7,09$; $p < 0,01$). A análise do perfil de migração do RNA viral pela técnica de PAGE demonstrou que todas as amostras positivas eram de rotavírus de grupo A com perfil

longo. Entre as 36 amostras positivas para rotavírus na PAGE foram encontrados sete eletroferótipos distintos, sendo que em cada rebanho ocorreu apenas um único eletroferotipo (Fig. 1). As principais diferenças estavam localizadas na posição de migração dos segmentos 2, 3, 7, 8 e 9.

A análise dos genótipos G e P foi realizada em 18 amostras positivas para rotavírus no PAGE e EIARA. No que se refere a genotipagem G animal observou-se a ocorrência do genótipo G6 em 11 (61,1%) amostras, G10 em uma amostra (5,5%) e em outras 6 (33,3%) amostras não foi obtida a tipificação G animal. Para o genótipo P, 6 (33,3%) amostras eram P[5] e 5 (27,8%) P[11], além da ocorrência do genótipo P [11][5] em 4 (22,2%) amostras, caracterizando a presença de infecções mistas, enquanto em 3 (16,7%) amostras não foi possível fazer a caracterização de genótipo P. (Tabela 2). A associação entre os genótipos G e P mostrou que as estirpes de rotavírus circulantes nos rebanhos eram G6P[5], G6P[11], G6P[11]P[5] e G10P[11].

No Brasil, vários estudos abordaram as características epidemiológicas da infecção por rotavírus em bezerros de rebanhos leiteiros, no entanto, há poucos estudos de abrangência epidemiológica em rebanhos bovinos de corte. Neste estudo foi determinada a ocorrência da infecção por rotavírus em bezerros de 14 rebanhos de corte do Estado de São Paulo, Brasil, na faixa etária de 1 a 60 dias, amostrados durante o período de julho de 2003 a julho de 2004.

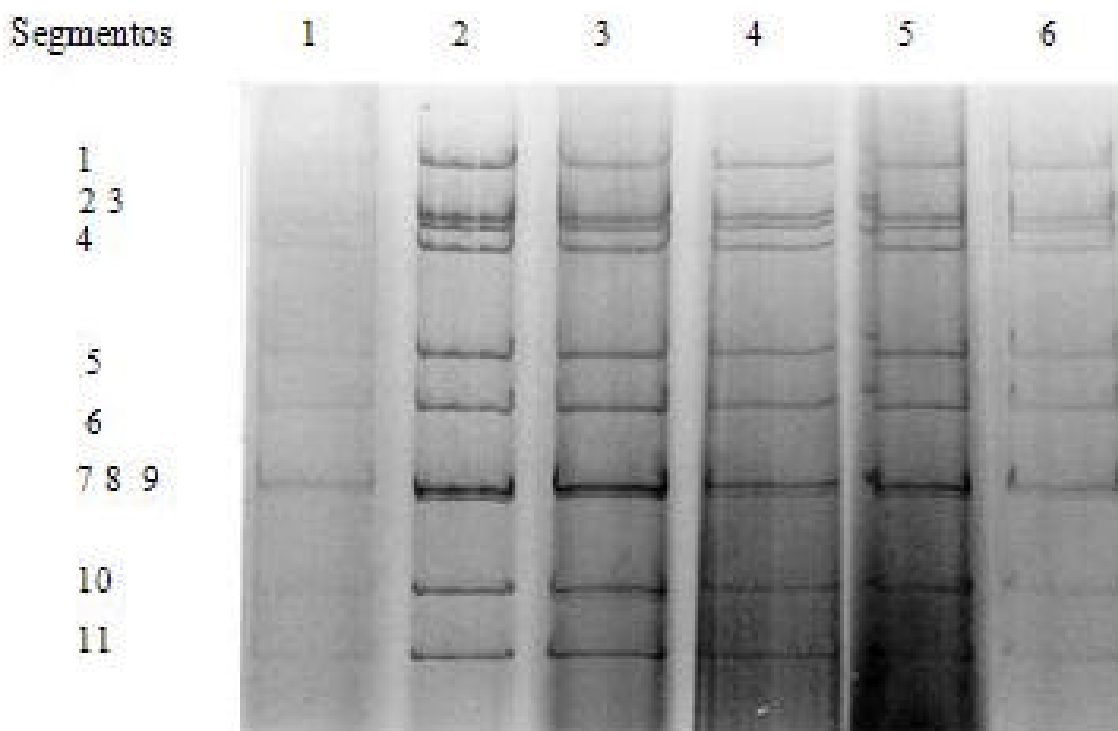


Fig. 1 - Perfil eletroforético do genoma de rotavírus do grupo A detectados em bezerros de rebanhos de corte no Estado de São Paulo. 1. estirpe de rotavírus padrão NCDV- Lincoln; 2, 3, 4, 5 e 6 estirpes de rotavírus de campo com o mesmo perfil eletroforético. Números à esquerda indicam os segmentos genômicos.

Tabela 1 - Resultado do ensaio imunoenzimático e eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção de rotavírus do grupo A em bezerros de rebanhos de corte de diferentes faixas etárias, segundo a consistência das fezes, em municípios do Estado de São Paulo, Brasil.

Idade (Dias)	Bezerro com diarreia			Bezerro sem diarreia			Total de Bezerros		
	Nº	Positivo	%	Nº	Positivo	%	Nº	Positivo	%
1 - 15	29	9	31,0	210	6	2,9	239	15	6,3
16 - 30	40	11	27,5	160	10	6,3	200	21	10,5
31 - 45	5	0	0,0	141	0	0,0	146	0	0,0
46 a 60	11	2	18,2	53	2	3,8	64	4	6,3
Total	85	22	25,9	564	18	3,2	649	40	6,2

Tabela 2 - Genotipagem das amostras positivas para rotavírus do grupo A pelo método de RT-PCR e semi (nested) multiplex para os genótipos G e P, em bezerros de rebanhos bovinos de corte de municípios do Estado de São Paulo, Brasil.

Genótipo	G[6]	G[10]	Não G	Total P
P[5]	6			6
P[11]	4	1		5
P[11] + P[5]	1		3	4
Não P			3	3
Total G	11	1	6	18

A ocorrência de positividade em 64,3% dos rebanhos amostrados indica expressiva circulação do agente nos rebanhos estudados. A taxa de ocorrência de rotavírus do grupo A na população estudada foi de 6,2% (40/649), porcentagem considerada inferior à obtida em outros trabalhos (LUCCHELLI *et al.*, 1992; COSTA MENDES *et al.*, 1993). Esse resultado se deve a grande quantidade de amostras colhidas de animais sem sinais clínicos de diarreia (n = 564; Tabela 1), correspondendo a 86,9% do total de amostras colhidas, o que contribuiu para diminuição da taxa de infecção, conforme também sugerido por LUCCHELLI *et al.* (1992).

A identificação de animais infectados, tanto no grupo de bezerros diarreicos (25,8%; 22/85) quanto em animais clinicamente saudáveis (3,2%; 18/564), é de grande importância no estudo da epidemiologia dos rotavírus, uma vez que sugere a presença de animais infectados subclínicamente e que podem atuar como fontes de infecção para os demais bezerros (FIJTMAN *et al.*, 1987; LUCCHELLI *et al.*, 1992).

Observou-se maior susceptibilidade dos bezerros jovens (16 a 30 dias) quando comparado aos animais mais velhos à infecção por rotavírus. Essa observação pode estar relacionada à deficiência de imunidade dos animais recém-nascidos, que dependem da transferência passiva de anticorpos maternos (IgG1 e IgA).

Para uma imunização eficiente, existe a recomendação da vacinação das fêmeas no final da gestação para que no momento do parto os títulos de anticorpos alcancem níveis protetores (FERNANDES *et al.*, 1998). Nenhum dos rebanhos amostrados adotava a vacinação de fêmeas gestantes como parte do programa de manejo sanitário. Assim, era de se esperar que a taxa de infecção nas primeiras semanas de vida fosse superior àquela detectada e, portanto, comparável aos encontrados em estudos com rebanhos leiteiros no Brasil (BUZINARO *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2000). No entanto, o manejo reprodutivo adotado na criação de gado de corte no Brasil, permitindo que os nascimentos ocorram na estação das chuvas, e a permanência dos bezerros junto às mães até o desmame pode estar contribuindo para redução da incidência de diarreia nos rebanhos. Ainda, nas criações mais extensivas há uma menor pressão da infecção que reduz a disseminação do vírus, interferindo na cadeia de transmissão e na taxa de infecção do rotavírus. Em outro estudo desenvolvido por BUZINARO *et al.* (2003) a frequência de infecção por rotavírus em rebanhos de corte foi muito superior (63,8%). Entretanto, esse trabalho foi realizado durante surto de diarreia, o que aumenta a probabilidade de detectar partículas virais e justifica a elevada taxa de prevalência observada.

Também foi verificada grande variação no perfil de migração do RNA de rotavírus quando analisados por PAGE, com sete eletroferótipos distintos, porém, em cada rebanho apenas um perfil foi identificado infectando os bezerros. A presença de um único eletroferótipo infectando bezerros, bem como a persistência de um mesmo perfil durante um determinado período de tempo já é bem documentada (BELLINZONI *et al.*, 1989; ISHIZAKI *et al.*, 1995).

A caracterização de rotavírus do grupo A quanto ao genótipo G, usando a técnica de (nested) PCR multiplex, mostrou predominância do genótipo G6 (61,1%) em relação ao G10 (5,5%). A predominância do genótipo G6 também foi confirmada em rebanhos bovinos no Japão (SUZUKI *et al.*, 1993; ISHIZAKI *et al.*, 1995) e Argentina (LUCCHELLI *et al.*, 1994; COSTANTINI *et al.*

al., 2002). No Brasil, FREITAS (2003), trabalhando com rebanhos bovinos leiteiros na mesma região do presente estudo, identificou os genótipos G6 (82%) e G10 (18%) como os mais prevalentes nas infecções por rotavírus. Resultados semelhantes foram obtidos por ALFIERI *et al.* (2004) que detectaram os genótipos G6 e G10 em 66% e 16% das amostras, respectivamente, enquanto BRITO *et al.* (2000) relataram o genótipo G10 como o mais freqüente (41,9%) durante um surto em bezerros com diarreia em rebanhos bovinos leiteiros.

Esses resultados confirmam a predominância e importância dos genótipos G6 e G10 na infecção de rebanhos bovinos, embora estirpes com outros genótipos já foram detectadas em outros estudos (BELLINZONI *et al.*, 1989; BLACKHALL *et al.*, 1992; BRÜSSOW *et al.*, 1992; MATSUDA *et al.*, 1989; REDMOND *et al.*, 1992; PARWANI *et al.*, 1992; HUSSEIN, 1993; GOUVEA *et al.*, 1994b).

Para o genótipo P as estirpes de rotavírus caracterizadas por RT-PCR foram P[5] (33,3%) e P[11] (27,8%). Estas também têm sido freqüentemente associadas à infecção por rotavírus tanto em rebanhos no Brasil (FREITAS *et al.* 2003; ALFIERI *et al.*, 2004), quanto em rebanhos de diferentes países (HUANG *et al.*, 1992; PARWANI *et al.*, 1993; GOUVEA *et al.*, 1994a; FUKAY *et al.*, 2002), o que comprova a predominância desses genótipos nas infecções por rotavírus em bovinos. Em quatro amostras de rotavírus houve evidência de infecção mista com o genótipo P[5]P[11] detectado em bezerros da mesma propriedade rural.

Em 16,7% das amostras analisadas por (nested) PCR multiplex não foi obtido banda viral amplificada para ambos os genótipos (G e P) apesar das mesmas conterem partículas virais detectadas no EIE e PAGE. Uma das razões pode estar relacionada à presença de inibidores nas fezes interferindo na desnaturação e no anelamento dos iniciadores, conforme salientado por GOUVEA *et al.* (1990). Também deve ser considerada a possibilidade das amostras não genotipadas pertencerem a estirpes de rotavírus com genótipos diferentes aos utilizados nesse estudo.

Estirpes que exibiram padrão eletroforético distintos no PAGE apresentaram o mesmo genótipo G e P, resultados semelhantes aos observados por BRITO *et al.* (2000) que detectaram diferentes perfis de rotavírus durante um surto de diarreia com o mesmo genótipo G e P.

Os dados do presente estudo indicaram uma expressiva circulação de rotavírus nas criações de bovinos de corte no Brasil, cujas características genotípicas mostraram predominância das estirpes G6P[11] e G6P[5]. Para reduzir a taxa de infecção e a permanência do agente nos rebanhos são indicadas medidas de higiene, manejo e de imunoprofilaxia. Porém, como a vacina disponível no mercado brasileiro é produzida com a estirpe NCDV-Lincoln (G6P[1]) e garante imunidade efetiva contra vírus homólogo à estirpe vacinal, o processo de imunização pode ficar comprometido.

Outros estudos devem ser realizados para maior conhecimento da epidemiologia molecular do rotavírus no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; BARREIROS, M.A.B.; LEITE, J.P.G.; RICHTZENHIN, L. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. *Veterinary Microbiology*, v.99, p.167-173, 2004.
- BELLINZONI, R.C.; BLACKHALL, J.; MATTION, N.M.; ESTES, M.K. Serological characterization of bovine rotaviruses isolated from dairy and beef herds in Argentina. *Journal of Clinical Microbiology*, v.27, n.11, p.2619-2623, 1989.
- BLACKHALL, J.; BELLINZONI, R.C.; MATTION, N.M.; ESTES, M.K.; LA TORRE, J.L.; MAGNUNSON, G. A bovine rotavirus serotype 1: serologic characterization of the virus and nucleotide sequence determination of structural glycoprotein VP7 gene. *Virology*, v.189, n.2, p.833-837, 1992.
- BRIDGER, J.C. Novel rotaviruses in animals and man. Novel diarrhoea viruses. In: CUBA FOUNDATION SIMPOSIUM, 12., 1987, Havana, Cuba. *Proceedings*. Havana, 1987. p.5-23.
- BRITO, W.M.E.D.; MUNFORD, V.; VILLAÇA, A.M.; CARUZO, T.A.R.; RÁCZ, M.L. Characterization of mixed infections with different strains of bovine rotavirus in an outbreak of diarrhea in dairy herds in Goiás, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, n.2, 2000.
- BRÜSSOW, H.D.; NAKAGOMI, O.; GERNA, G.; EICHHORN, W. Isolation of an avian-like group A rotavirus V1005 a P5, not a P12, type like all viruses in a German survey. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.67-74, 1992.
- BUZINARO, M.G.; MUNFORD, V.; BRITO, W.M.E.D.; RÁCZ, M.L.; JEREZ, J.A. Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.52, n.6, p.555-561, 2000.
- BUZINARO, M.G.; MISTIERI, M.L.A.; CARVALHO, A.A.B.; SAMARA, S.I.; REGITANO, L.C.A.; JEREZ, J.A. Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, n.3, p.266-270, 2003.

- COSTA MENDES, V. M.; BEER, M.; PEENZE, I.; STEELE, A.D. Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in South African calves. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.12, p.3333-3335, 1993.
- COSTANTINI, V.; PARRENO, V.; BARRANDEGO, M.; COMBASSIES, G.; BARDON, J.C.; LEUNDA, M.; SAIF, L.; FERNANDEZ, F. Group A bovine rotavirus diagnosis and antigenic characterization of strains circulation in the Argentine Republic, 1994-1999. *Revista Argentina de Microbiologia*, v.34, p.110-116, 2002.
- ESTES, M.K.; COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.53, n.4, p.410-449, 1989.
- FERNANDEZ, F.M.; CONNER, M.E.; HODGINS, D.C.; PARWANI, A.V.; NIELSEN, P.R.; CRAWFORD, S.E.; ESTES, M.K.; SAIF, L.J. Passive immunity to bovine rotavirus in newborn calves fed colostrum supplements from cows immunized with recombinant SA11 rotavirus core-like particle (CLP) or virus-like particle (VLP) vaccines. *Vaccine*, v.16, n.5, p.507-516, 1998.
- FIJTMAN, N.L.; BARRANDE GUY, M.E.; CORNAGLIA, E.M.; SCHUDEL, A.A. Variations and persistency of electropherotypes of bovine rotavirus field isolates. *Archives of Virology*, v.96, p.275-81, 1987.
- FREITAS, P.P.S. *Prevalência de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros pertencentes a associados da Cooperativa de São Carlos e Rio Claro (Colascric)*. 2003. 65f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2003.
- FUKAY, K.; SAKAI, T.; HIROSE, M.; ITOI, T. Prevalence of calf diarrhea caused by bovine group A rotavirus carrying G serotype 8 specificity. *Veterinary Microbiology*, v.66, p.301-311, 1999.
- FUKAY, K.; MAEDA, Y.; FUJIMOTO, K.; ITOU T.; SAKAI, T. Changes in the prevalence of rotavirus G and P types in diarrheic calves from the Kagoshima prefecture in Japan. *Veterinary Microbiology*, v.86, p.343-349, 2002.
- GENTSCH, J.R.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; GOVEA, 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, p.1365-1373, 1992.
- GOUVEA, V.; GOUVEA, V.; GLASS, R.I.; WOODS, P.; TANIGUCHI, K.; CLARK, H.F.; FORRESTER, B.; FANG, Z. 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. Identification of bovine and porcine rotavirus G types by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.5, p.1338-1340, 1994a.
- GOUVEA, V.; SANTOS, N.; TIMENETSKY, M.C. VP4 typing of bovine and porcine group A rotavirus by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.5, p.1333-1337, 1994b.
- 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.473-77, 1982.
- HUSSEIN, H.A.; PARWANI, A.V.; ROSEN, A.; LUCCHELLI, A.; SAIF, J. Detection of rotavirus serotypes G1, G2, G3, and G11 in feces of diarrheic calves by using polymerase chain reaction-derived cDNA probes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, n.9, p.2491-2498, 1993.
- HUANG, J.A.; NAGESHA, H.S.; SNODGRASS, D.R.; HOLMES, I.H. Molecular and serological analysis of two calf scours in Australia. *Journal of Clinical Microbiology*, v.30, p.85-92, 1992.
- ISHIZAKI, H.; OHTA, C.; SHIRAHATA, T.; GOTO, H.; TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA, S. Persistence of a single electropherotype and serotype (G6P5) of bovine rotavirus in calves on a closed dairy farm from 1990 to 1993. *American Journal of Veterinary Research*, v.56, p.1019-24, 1995.
- KLINGENBERG, V.; SVENSSON, L. Group A rotavirus as a cause of neonatal calf enteritis in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.39, p.195-199, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v.227, p.680-685, 1970.
- LUCCHELLI, A.; LANCE, S.E.; BARTHETT, P.B.; MILLER, G.Y.; SAIF, L.J. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. *American Journal of Veterinary Research*, v.53, p.169-74, 1992.
- LUCCHELLI, A.; KANG, S.Y.; JAYASEKERA, M.K.; PARWANI, A.V.; ZEMAN, D.H.; SAIF, L.J. A survey of G6 and G10 serotypes of group A bovine rotaviruses from diarrheic beef and dairy calves using monoclonal antibodies in Elisa. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, n.6, p.175-81, 1994.
- MATSUDA, Y.; NAKAGOMI, O.; OFFIT, P.A. Presence of three P types (VP4 serotypes) and two G types (VP7 serotypes) among bovine rotavirus strains. *Archives of Virology*, n.115, p.199-207, 1990.
- PARWANI, A.V.; ROSEN, B.I.; FLORES, J.; MCCRAE, M.A.; GORZIGLIA, M.; SAIF, L.J. Detection and

differentiation of bovine group A rotavirus serotypes using polymerase chain reaction generated probes to the VP7 gen. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.4, p.148-158, 1992.

PARWANI, A.V.; HUSSEIN, H.A.; ROSEN, B.; LUCCHELLI, A.; NAVARRO, L.; SAIF, L.J. Characterization of field strains of group A bovine rotaviruses by using polymerase chain reaction-generated G; P type specific cDNA probes. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.2010-2015, 1993.

PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; CANDEIAS, J.A.N.; RÁCZ, M.L., LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; TRABULSI, L.R. Electrophoretic study of the genome of human rotaviruses from Rio de Janeiro, São Paulo and Pará, Brazil. *Journal of Hygiene*, v.80, p.117-25, 1983.

PEREIRA, M.G. *Epidemiologia: teoria e prática*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 596p.

REDMOND, D.L.; INGLIS, N.F.; FITZGERALD, D.R.; SNODGRASS, D.R.; HERRING, A. A Liquid hybridization method for typing the VP4 and VP7 genes of bovine rotaviruses. *Journal of Virological Methods*, v.39, p.165-177, 1992.

SNODGRASS, D.R.; TERZOLO, H.R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J.D. Aetiology of diarrhoea in young calves. *Veterinary Record*, v.12, n.119, p.31-34, 1986.

SNODGRASS, D.R.; FITZGERALD, T.; CAMPBELL, I.; SCOTT, F.M.M. Rotavirus serotypes 6 and 10 predominate in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n.3, p.504-507, 1990.

SUZUKI, Y.; SANETAKA, T.; SATO, M.; TAJIMA, K.; MATSUDA, Y.; NAKAGOMO, O. Relative frequencies of G (VP7) and (VP4) serotypes determined by polymerase chain reaction assays among Japanese bovine rotavirus isolated in cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.3046-3049, 1993.

TANIGUCHI, K.; URASAWA, T.; URASAWA S. Independent segregation of the VP4 and the VP7 genes in bovine rotaviruses as confirmed VP4 sequence analysis of G8 and G10 bovine rotavirus strains. *Journal of General Virology*, v.74, p.1215-1221, 1993.

Recebido em 10/11/07
Aceito em 20/11/08