

PESQUISA DE ROTAVÍRUS EM BEZERROS BOVINOS NO MUNICÍPIO DE IGARAPÉ-AÇU (PA)¹.

René Ribeiro SILVA²

Daniele Martins BARROS³

Raimundo Kleber A. SOUZA⁴

Antônio Horta MOREIRA⁴

Heriberto Ferreira FIGUEIREDO⁵

RESUMO: Os rotavírus são importantes agentes de gastroenterite em bezerros bovinos e outros animais jovens (suínos, ovinos, etc.), podendo, ainda, infectar o homem. O presente estudo foi desenvolvido com o objetivo de determinar a prevalência das infecções por rotavírus em bezerros bovinos no município de Igarapé-Açu (PA), identificando os eletroferotipos prevalentes na região. No período de junho/94 a abril/97 foram colhidas 200 amostras fecais de animais com idades variando de três dias a dez meses. Após a colheita, identificaram-se as amostras que foram acondicionadas a -20°C e remetidas ao laboratório, onde se prepararam suspensões a 10%(v/v) em tampão de fosfatos (PBS pH 7,4). Posteriormente, foram submetidas à prova de aglutinação do látex (AL) e eletroforese do RNA em gel de poliacrilamida (PAGE). Das 200 amostras colhidas, 75 (37,5%) eram de animais sem diarreia e 125 (62,5%) caracterizadas como diarréicas; um (0,5%) dos espécimes resultou positivo para rotavírus, sendo proveniente de um bezerro diarréico. Apesar do baixo índice de positividade registrado na presente investigação, impõe-se a vigilância sistemática das diarréias em bezerros, com ênfase para os rotavírus.

TERMOS PARA INDEXAÇÃO: Bezerros Bovinos, Rotavírus, Aglutinação do Látex, Eletroforese.

ROTAVIRUS RESEARCH IN CATTLE CALVES OF IGARAPÉ-AÇU, PARA, BRAZIL

ABSTRACT: Rotavirus is an important agent of gastroenteritis in bovine calves and other young animal species (sheep and pigs, etc.), being even able to infect man. This research had the objective to determine the prevalence of rotavirus infection in calves from Igarapé Açu and to identify eletroferotypes in this region. 200 fecal samples were collected from bovine calves (ages ranging between 3 days and 10 months) through June of 1994 to April of 1997. The samples were identified, stored at -20°C and sent to the laboratory where a 10% (v/v) suspension was made in a saline phosphate buffer (PBS pH 7,4). These samples were tested by the latex agglutination test (AL) and electrophoresis of RNA in Polyacrylamide gel (PAGE). 75 (37,5%) out of 200 fecal samples were from diarrheic free and 125 (62.5%) were from diarrheic infected calves. One of the

¹ Aprovado para publicação em 26.12.2001

² Médico Veterinário, Aluno de Pós-Graduação do Curso de Ciência Animal da Universidade Federal do Pará – UFPA

³ Bolsista Iniciação Científica UAPG – Faculdade de Ciências Agrárias do Pará – FCAP

⁴ Médico Veterinário, Especialista, Professor Adjunto da FCAP.

⁵ Médico Veterinário da FCAP. Especialista

diarrheic calf (0,5%) was rotavirus positive. Even though a low positive rate of infection was recorded in this study, surveillance for diarrhea among calves should be a routine in the region.

INDEX TERMS: Bovine Calf, Rotavirus, Latex Agglutination Test, Electrophoresis of RNA.

1 INTRODUÇÃO

Bishop et al (1973); Flewett, Bryden e Davies (1973) foram os pioneiros na detecção dos rotavírus, através da visualização de partículas virais na mucosa duodenal de crianças diarreicas, utilizando a microscopia eletrônica como método diagnóstico. Os rotavírus pertencem à família Reoviridae, possuindo em sua constituição ácido ribonucléico de cadeia dupla (dsRNA), com 11 segmentos genômicos. São classificados antigenicamente em grupos de A a G, com base no antígeno comum de grupo, a proteína VP6 (ESTES, 1996).

A pecuária bovina de corte e leiteira é um dos grandes ramos da economia brasileira, sendo de suma importância conhecerem-se os motivos que possam causar problemas ao pleno desenvolvimento, a fim de serem tomadas medidas adequadas evitando o aparecimento destes entraves. Nesse contexto, deve-se levar em consideração o aparecimento das diarreias de natureza virótica, bacteriana e parasitária, decorrentes de falhas no manejo e outras causas. Dentre as diarreias de cunho infeccioso, destacam-se as causadas pelos rotavírus, que são agentes enteropa-

togênicos causadores de gastroenterites em crianças de baixa idade (LINHARES et al., 1996) e em uma ampla variedade de espécies animais, como bovinos e suínos, por exemplo, apresentando distribuição universal (FERNANDEZ et al., 1986; LINHARES et al., 1986; CASTRO et al., 1988; ALFIERI; ALFIEERI; RESENDE, 1989; RODRIGUES et al., 1989; BELLINZONI et al., 1990; HASSO; PANDEY, 1990; ABRAHAM et al., 1992; LUCCHELLI et al., 1992; COSTA MENDES et al., 1993; BRITO, 1994; MADIGAN, 1994; SUNILCHANDRA; MAHALINGAM, 1994; GUEGUEN et al., 1996).

A ocorrência de rotavírus em bezerros bovinos, particularmente, reserva grande interesse, uma vez que são causadores de consideráveis prejuízos econômicos (atraso no crescimento, tempo incorreto para abate, peso inadequado ao abate, entre outros), sendo responsáveis por infecções em recém-nascidos e jovens na faixa etária dos três primeiros dias aos dois meses de vida, com quadro diarreico de evolução aguda (BENESI, 1996). Segundo Kilari et al (1996), a diarreia severa leva à desidratação e posterior morte. A morbidade é alta (50%) e a letalidade é baixa (10%), Torres⁶ (1959

⁶ TORRES, A.J. *Influências de alguns fatores na mortalidade de bezeros em Viçosa (MG)*. 1959. 63 p. Dissertação (Mestrado) – UFMG. Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 1959.

apud BENESI, 1996) fez um estudo sobre o impacto das infecções entéricas na população bovina do Brasil e concluiu que leva a um prejuízo anual de, aproximadamente, 100 milhões de dólares.

O presente estudo teve como objetivo estudar a ocorrência de rotavírus em bezerros bovinos nas fazendas do município de Igarapé-Açu (PA), identificando os perfis eletroforéticos circulantes na região.

2 MATERIAL E MÉTODOS

No período de junho de 1994 a maio de 1997 foram colhidas amostras fecais provenientes de 200 bezerros bovinos com idades variando de três dias a dez meses, em fazendas do município de Igarapé-Açu (PA). As amostras foram classificadas como diarréicas quando apresentavam consistência que variava de pastosa a líquida. Também foram colhidos espécimes com aspecto e consistência normais, oriundos de animais aparentemente saudáveis. A colheita foi feita sob estímulo na ampola retal, utilizando-se o dedo indicador com o auxílio de luva estéril. Após a colheita em frascos próprios e identificação em campo, as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo, sendo então transferidas ao laboratório e estocadas a -20°C até o momento de processamento. Os métodos utilizados neste trabalho foram o teste de aglutinação do látex (AL) (Slidex Rota Kits 2, BioMérieux, França) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE).

2.1 PROVA DA AGLUTINAÇÃO DO LÁTEX (AL)

Todas as amostras foram submetidas ao teste de AL, sendo que o "kit" utilizado era constituído de partículas de látex sensibilizadas com anticorpo monoclonal específico para rotavírus do grupo A, permitindo detectar nas fezes o antígeno correspondente por uma técnica de aglutinação (SANDERES; CAMPBELL; JENKINS, 1986). Os testes eram realizados segundo as especificações do fabricante.

Os reativos látex R1 (partículas de látex sensibilizadas com anticorpo) e R2 (controle) eram bem homogêneos e, em seguida, era depositada sobre a placa uma gota de R1 em cada círculo desejado, de acordo com o número de amostras a serem testadas. Em seguida, uma gota de R2 era depositada em cada círculo abaixo e correspondente aos de R1. Adicionava-se uma gota (50 µl) do sobrenadante fecal em cada círculo onde foram colocados os reagentes, homogêneo com o bastão de plástico de uso único para cada círculo. A seguir, imprimia-se à placa um ligeiro movimento de rotação.

A reação positiva se dava com o aparecimento de uma aglutinação em menos de dois minutos no círculo correspondente ao R1 e ausência de aglutinação em R2. Na reação negativa, observou-se ausência de aglutinação em ambos os círculos.

2.2 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Suspensões fecais na concentração de 10% (v/v), em tampão de fosfatos (PBS pH 7,4) foram preparadas e centrifugadas a 3 000 rpm por 10 minutos sob refrigeração (4°C). O sobrenadante colhido foi então submetido aos referidos testes. O RNA viral foi extraído através da adição de agentes quelantes (fenol/clorofórmio) e precipitado com etanol. Posteriormente, a preparação foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, com concentração final de 5%, por três a quatro horas, a 100 volts (PEREIRA et al., 1983). As bandas foram visualizadas em negatoscópio de luz branca, após coloração pelo nitrato de prata (HERRING et al., 1982).

3 RESULTADOS

Das 200 amostras analisadas, observou-se que 97 (48,5%) eram de machos e 103 (51,5%) de fêmeas (Tabela 1). Das 97 amostras provenientes de machos, 68 (61,1%) eram diarréicas e 29 (29,8%), não-diarréicas. Das 103 amostras oriundas de fêmeas, 57 (55,3%) eram diarréicas, e o restante, 46 (44,6%), não-diarréicas. Foram colhidas, em média, 50 amostras por ano.

Com relação à consistência das amostras, 125 (62,5%) eram diarréicas (entre pastosa e líquida) e 75 (37,5%), normais.

Tabela 1 – Distribuição das amostras fecais de bezerros bovinos, segundo a faixa etária dos animais e consistência das fezes. Junho/94 a maio/97. Igarapé-Açu (PA)

Idade (meses)	Diarréicos	%	Não-diarréicos	%	Total	%
MACHO						
0 – 3	53	75,7	17	24,3	70	72,2
4 – 6	12	50,0	12	50,0	24	24,7
7 – 10	3	100,0	-	-	3	3,1
TOTAL	68	70,1	29	29,9	97	48,5
FÊMEA						
0 – 3	40	60,6	26	39,4	66	64,1
4 – 6	15	44,1	19	55,9	34	33,0
7 – 10	2	66,7	1	33,3	3	2,9
TOTAL	57	55,3	46	44,7	103	51,5
TOTAL GERAL	125	62,5	75	37,5	200	100,0

Nota: Sinal convencional utilizado:

- Valor número igual a zero não resultante de arredondamento

De todos os espécimes fecais analisados, tanto pela AL quanto pela PAGE, apenas um se revelou positivo para rotavírus (Figura 1), colhido em janeiro de 1997, o qual foi proveniente de um bezerro diarréico com oito dias de vida.

4 DISCUSSÃO

A detecção de apenas um caso positivo para rotavírus, apesar do longo intervalo de tempo da pesquisa (três anos) no município, constitui-se em indício da circulação desses vírus entre bezerros na região.

Selim et al. (1991) utilizaram animais com idade variando entre um dia e um ano de vida, verificando maior positividade em animais na faixa etária de uma semana de

vida (22,2%). Já Abraham et al. (1992) relatam que a maioria dos casos positivos detectados são de animais com cinco semanas de idade (16,7%). Kamijolo e Adesiyun (1994) verificaram que a maioria dos casos de rotavírus encontrados era em bezerros com idade variando entre um e seis semanas (72,6%). Dhanaraj, Ramadass e Raghavan (1996) concluíram que a infecção por rotavírus em bezerros ocorre com maior frequência entre 0 e 15 dias de idade (53,3%).

Acredita-se, entretanto, que nesta pesquisa, a baixa positividade encontrada para rotavírus 1/125 dos casos diarréicos (0,5%) deve-se à pesquisa do citado agente em diversas faixas etárias (Tabela 1), pois se tratou da primeira pesquisa em bezerros

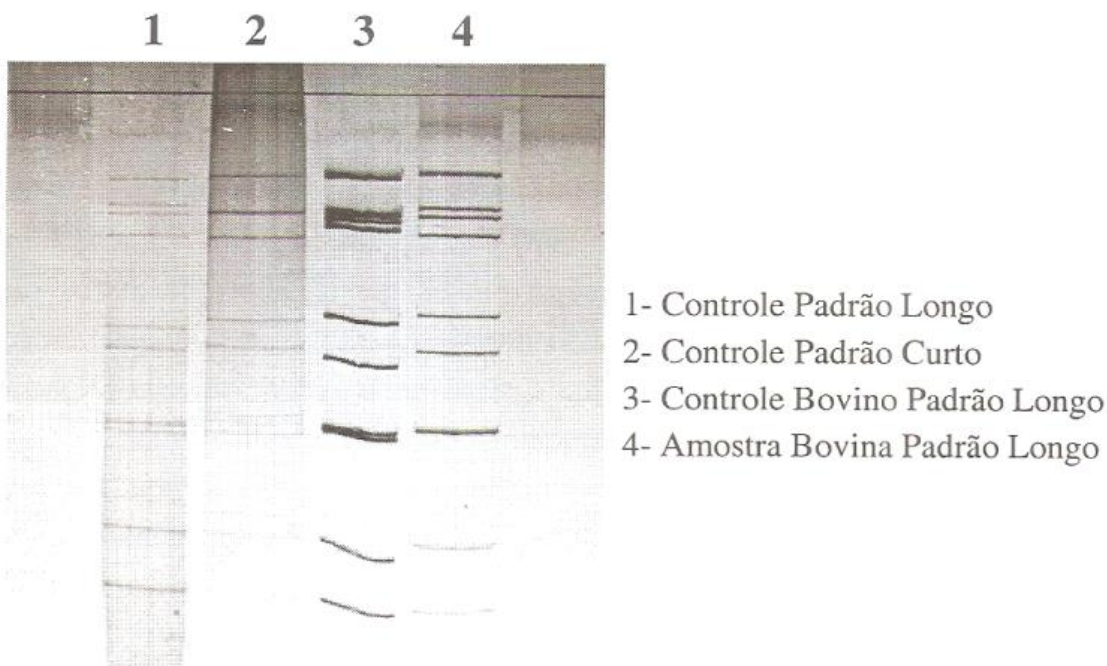


Figura 1 – Perfil eletrofonético de rotavírus bovino detectado em Igarapé-Açu (PA)

bovinos envolvendo tal agente no Estado. Note-se, que neste estudo, as idades variaram de 0 a 10 meses nos machos e 0 a 9 meses nas fêmeas, com o rotavírus sendo detectado em bezerro com oito dias de vida. Portanto, admite – se que a concentração das colheitas na faixa etária de 0 a 1 mês (maior ocorrência de rotavírus), ofereceria maior índice de positividade.

Murakami⁷ et al. (1986 apud BEZEK, 1994), estudando bezerros recém-nascidos, observaram que a excreção dos rotavírus ocorreu um dia após a infecção, com o pico máximo de excreção entre 2 e 5 dias após a infecção. Linhares, Carvalho e Gabbay (1984) inocularam experimentalmente um bezerro de 90 horas de vida, que não havia recebido o colostro materno, com cepa de rotavírus bovino, via oral e, neste caso, o rotavírus só foi encontrado nas fezes 48 horas após a inoculação do agente, simultaneamente ao aparecimento de diarreia no animal inoculado. Neste estudo, entretanto, o não acompanhamento do tratador da fazenda quanto ao início da diarreia no bezerro em que se detectou o rotavírus não permitiu saber ao certo o início da infecção no animal, já que o período de incubação dessa virose, em geral, é de 12 a 24 horas (BENESI, 1996).

Embora a mortalidade decorrente da infecção por rotavírus em animais jovens seja baixa (1,6% em bezerros com idades

inferiores a 30 dias), suas conseqüências, freqüentemente, resultam em desidratação e acidose metabólica severa, levando o animal ao óbito (BEZEK, 1994). O bezerro infectado neste estudo apresentava um quadro de diarreia líquida, com moderado estado de fraqueza e desidratação.

Estudo realizado na Índia mostrou que a maior incidência de infecção por rotavírus ocorre durante os meses de inverno (principalmente, novembro e dezembro). No verão, a incidência foi baixa (DHANARAJ et al., 1996). Isto não foi possível determinar neste estudo, devido à baixa positividade encontrada.

Os rotavírus do grupo A são os mais importantes epidemiologicamente e comumente encontrados na literatura (CHANG; PARWANI; SAIF, 1996; FUKAI; SAKAI; KAMATA, 1998; KLINGENBERG; SVENSSON, 1998). PARWANI; LUCHELLI; SAIF (1996) descreveram a presença de rotavírus do grupo B em vacas adultas diarreicas. Segundo Fukai et al. (1998), os rotavírus do grupo A apresentam três tipos de perfis eletroforéticos ou eletroferotipos: longo, curto e supercurto. Após análise pela PAGE, observa-se que a amostra (Figura 1, coluna 4) agrupa os segmentos genômicos da seguinte forma: 4 na classe I (primeiro grupamento), 2 na classe II, 3 na classe III e 2 na classe IV.

⁷ MURAKAMI, Y.; NISHIOKA, N.; WATANABE, T.; KUNIYASU, C. Prolonged excretion and failure of cross-protection between distinct serotypes of bovine rotavirus. *Vet. Microbiol.*, v. 12, p. 7-14, 1996

Esta disposição permite admitir que o rotavírus bovino encontrado em Igarapé-Açu (PA) pertence ao grupo A e apresenta perfil eletroforético longo.

A partir deste caso, novos trabalhos podem ser desenvolvidos com a finalidade de verificar outros perfis eletroforéticos, assim como estabelecer parâmetros representativos quanto à prevalência da infecção por rotavírus na região, bem como estender a pesquisa a outras espécies.

5 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que:

a) foi comprovada a presença de rotavírus no município de Igarapé-Açu (PA), mesmo que restrito a apenas um caso, o que não descarta a possibilidade de se registrar um maior número, desde que as pesquisas na área sejam ampliadas;

b) o teste da AL é uma ferramenta que pode ser utilizada como recurso diagnóstico em virtude da rapidez na execução do teste, elevada sensibilidade e especificidade comparada à eletroforese;

c) a eletroforese também se constitui em importante ferramenta laboratorial visando a caracterização dos diferentes grupos;

d) o perfil eletroforético do rotavírus de grupo A encontrado corresponde ao tipo longo;

e) a faixa etária compreendendo a primeira semana de vida é a de eleição para

a colheita de espécime fecal visando à detecção do rotavírus;

f) torna-se necessária a implementação de nova pesquisa visando outras regiões, a fim de conhecer-se melhor a epidemiologia desses vírus no Pará.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Evandro Chagas (I.E.C) pelo suporte laboratorial e a todos os funcionários do Serviço de Virologia Geral. Aos Médicos Veterinários Jorge Luís Cavalcante, Luís Fernando Moraes Moreira e Agaílton Dias Arruda que viabilizaram as colheitas em Igarapé-Açu, bem como à toda equipe da Fazenda Escola.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, G., ROEDER, P.L.; ZEWDU, R. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v.24, n.2, p.74-80, 1992.
- ALFIERI, A.; ALFIEERI, A.A.; RESENDE, M. Ocorrência de rotavírus A e não A em suínos detectados por ensaio imunoenzimático e eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ENCONTRO REGIONAL DE VIROLOGIA, 1., 1989, Florianópolis. Florianópolis, 1989.
- BELLINZONI, R.C.; BLACKHALL, J.; TERZOLO, H.R.; MOREIRA, A.R.; AUZA, N.; MATTION, N.; MICHEO, G.L.; LATORRE, J.L.; SCODELLER, E.A. Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.*, v.22, n.3, p.130-136, 1990.
- BENESI, F.J. Diarréia infecciosa neonatal dos bezerros. In: SIMPÓSIO PFIZER SOBRE DOENÇAS INFECCIOSAS E VACINAS PARA BOVINOS, 1., 1996, Guarulhos. *Anais...* Guarulhos, 1996. p.15-24.

- BEZEK, D. Rotavirus enteritis in food animals. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v.16, n.3, p.391-404, 1994.
- BISHOP, R. F.; DAVIDSON, G. P.; HOLMES, H.; RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *The Lancet*, v.2, p.1281-83, 1973.
- BRITO, W.M.E.D. The bovine rotavirus in the state of Goiás. *Rev. Microbiol*, v.25, n.4, p.229-234, 1994.
- CASTRO, L.; ARAUJO, H.P.de.; FIALHO, A.M.; GOUVEIA, V.S.; PEREIRA, H.G. Serological evidence of rotavirus infection in a guinea-pig colony. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.83, p.411-413, 1988.
- CHANG, K. O.; PARWANI, A. V.; SAIF, L. J. The characterization of VP7 (G Type) and VP4 (P Type) genes of bovine group A rotaviruses from field samples using RT-PCR and RFLP analysis. *Archives of Virology*, v.141, n.9, p.1727-1739, 1996.
- COSTA MENDES, V.M.da.; BEER, M.de.; PEENZE, I.; STEELE, A.D. Molecular epidemiology and subgroup analysis of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in South African calves. *J. Clin. Microbiol*, v.31, n.12, p.3333-3335, 1993.
- DHANARAJ, V.; RAMADASS, P.; RAGHAVAN, N. Epidemiological studies on rotaviral infection. *The Indian Veterinary Journal*, v.73, n.11, p.1113-1116, 1996.
- ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: FIELDS, B.N. et al. *Virology fields*. 3ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Pub., 1996. p.1625-1655.
- FERNANDEZ, F.M.; RESENDE, TOLEDO, V.P.C.; NASCIMENTO, E.; HENRIQUE, B.; TAVARES, C.A.P.; LEITE, R.C.; CASTRO, M.C.G.; RODRIGUES, N.A. Bovine rotavirus in Minas Gerais: a preliminary report. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 3., 1986, São Lourenço (MG). São Lourenço (MG), 1986.
- FLEWETT, T. H.; BRYDEN, A. S.; DAVIES, H. Virus particles in gastroenteritis. *The Lancet*, v.2, p.1497, 1973.
- FUKAI, K.; SAKAI, T.; KAMATA, H. Distribution of G serotypes and P genotypes of bovine group A rotavirus isolated in Japan. *Australian Veterinary Journal*, v.76, n.6, p.418-422, 1998.
- GUEGUEN, C.; MAGA, A.; McCRAE, M.A.; BATAILLON, G. Caprine and bovine B rotaviruses in Western France: group identification by northern hybridization. *Vet. Res.*, v.27, n.2, p.171-176, 1996.
- HASSO, S.A.; PANDEY, R. Detection of rotavirus antigen from buffalo calves in Iraq. *J. Diarrhoeal. Dis. Res.*, v.8, n.4, p.168-169, 1990.
- HERRING, A.J. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamid gels. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, p.473-477, 1982.
- KAMIJOLO, J.S.; ADESIYUN, A.A. Rotavirus infection in calves, piglets, lambs and goat kids in Trinidad. *Br. Vet. J.*, v.150, n.3, p.293-299, 1994.
- KILARI, S.; SINGH, S.N.; SABARINATHAN, R.; PANDITA, N.; KULKARNI, V.B. Diagnosis of rotavirus induced diarrhoea by PAGE analysis. *The Indian Veterinary Journal*, v.73, n.11, p.455-456, 1996.
- KLINGENBERG, K. de V.; SVENSSON, L. Group A rotavirus as a cause of neonatal calf enteritis in Sweden. *Acta Vet. Scand.*, v.39, n.2, p.195-199, 1998.
- LINHARES, A.C.; CARVALHO, R.A.; GABBAY, Y.B. Infecção experimental por rotavírus em bezerro recém-nascido. *Rev. Lat. Am. Microbiol.*, v.26, p.15-20, 1984.
- ; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P.; OLIVEIRA, C.S.; GUSMÃO, R.H.P. Gastroenterites por rotavírus. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 274-285.

LINHARES, A.C.; PEREIRA, J.D.M.; NAKAUTH, C.M.; GABBAY, Y.B. Rotavirus infection in wild marsupials (*Didelphus marsupialis*) of the Amazon Region Trans. Rev. Soc. Trop. Med. Hyg, v.80, p.20-24, 1986.

LUCHELLI, A.; LANCE, S.E.; BARTLETT, P.B.; MILLER, G.Y.; SAIF, L.J. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. *Am. J. Vet. Res.*, v.53, n.2, p.169-174, 1992.

MADIGAN, J.E. Diarrhea in foals. *Ars Veterinária*, v.10, n.2, p.112-115. 1994.

PARWANI, A.V.; LUCHELLI, A.; SAIF, L.J. Identification of group B rotaviruses with short genome electropherotypes from adult cows with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.*, v.34, n.5, p.1303-1305, 1996.

PEREIRA, H.G. et al. Comparison of polyacrilamida gel electrophoresis (PAGE), immunoelectron microscopy (IME) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.78, p.483-490, 1983.

RODRIGUES, M.A.; MONTEIRO, J.M.; FERREIRA, JR.E.E.; CONSTANTINO, A.F.; PEDROSO, A.L.; SILVA, J.C. Estudo das diarreias em camundongos neonatos no TECPAR. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE VIROLOGIA, 1., 1989, Florianópolis. Florianópolis, 1989.

SANDERES, R.C.; CAMPBELL, A.D.; JENKINS, M.F. Routine detection of human rotavirus by látex agglutination: Comparison with enzyme linked immunosorbent assay, electron microscopy and polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Virol. Methods*, v.13, p.285-290, 1986.

SELIM, S.A.; AZIZ, K.M.; SARKER, A.J.; RAHMAN, H. Rotavirus infection in calves in Bangladesh. *Vet. Res. Commun.*, v.15, n.4, p.327-333, 1991.

SUNIL-CHANDRA, N.P.; MAHALINGAM, S. Rotavirus associated diarrhoea in buffalo calves in Sri Lanka. *Res. Vet. Sci.*, v.56, n.3, p.393-396, 1994.