

ROTAVÍRUS DO GRUPO A EM BEZERROS LACTENTES NO ESTADO DE MINAS GERAIS

GROUP A ROTAVIRUS IN CALVES IN MINAS GERAIS STATE, BRAZIL

Edel Figueirêdo Barbosa¹ Henrique César Pereira Figueiredo² Adriana Melo Garcia³
Zélia Inês Portela Lobato⁴ Andrey Pereira Lage⁵

RESUMO

A frequência de rotavírus do grupo A foi avaliada em 194 amostras de fezes de bezerros, com idade entre 2 e 60 dias, provenientes de 33 propriedades da bacia leiteira de Pará de Minas, Minas Gerais. Utilizando um sistema de ELISA monoclonal direto, 33 (17%) destas amostras foram positivas para rotavírus do grupo A. Do total de animais positivos para rotavírus do grupo A, 60,6% apresentavam diarreia no momento da coleta. Das 33 propriedades amostradas, a presença de rotavírus foi detectada em 19 (57,6%). Dentre todas as amostras examinadas, somente 7 apresentaram simultaneamente rotavírus e *Cryptosporidium spp.*

Palavras-chave: Rotavírus do grupo A, *Cryptosporidium spp.*, bezerros, diarreia, Minas Gerais, Brasil.

SUMMARY

The frequency of group A rotaviruses was evaluated in 194 calves, 2- to 60-days old, from 33 farms in Pará de Minas, Minas Gerais State, Brazil. One hundred and ninety four fecal specimens were tested in a direct monoclonal ELISA and 33 (17%) were positive to group A rotavirus. Diarrhea was present in 60,6% of rotavirus-infected calves at the time of feces collection. Group A rotaviruses were detected in 19 (57,6%) of the studied farms. Among all calves tested only seven were infected simultaneously by group A rotavirus and *Cryptosporidium spp.*

Key words: Group A rotavirus, *Cryptosporidium spp.*, calves, diarrhea, Minas Gerais, Brazil.

INTRODUÇÃO

A diarreia é considerada um dos mais importantes fatores que contribuem para a morbidade e mortalidade em bezerros recém-nascidos. Recentemente, em estudo realizado no Estado de Minas Gerais, demonstrou-se que a taxa de mortalidade de bezerros está em torno de 14% e com uma tendência histórica de manutenção nos últimos 25 anos (FROIS *et al.*, 1994), sendo a diarreia um importante fator de manutenção destas taxas (LEITE *et al.*, 1982). Embora existam até o momento seis grupos distintos (A-F), identificados através da proteína viral 6 - VP₆, (DODET *et al.*, 1997), o rotavírus pertencente ao grupo A tem sido relatado como o mais freqüente agente etiológico da diarreia dos bezerros (BARRAGRY, 1997, BELLINZONI *et al.*, 1990, LIEBLER *et al.*, 1992). Apesar dos vários estudos relativos à diarreia em bezerros causada por rotavírus do grupo A, realizados em outros países, e de rotavírus já ter sido identificado como agente causal de diarreia em humanos (GOMES *et al.*, 1991), em frangos de corte (BARBOSA *et al.*, 1992) e em suínos (GOUVEIA *et al.*, 1991) no Brasil, pouco se sabe sobre sua importância na diarreia de bezerros neonatos em nosso meio.

¹Médico Veterinário, Professor Adjunto, PhD. Laboratório de Biologia de Microorganismos Intracelulares, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Brasil. Av. Antonio Carlos, 6627, CP 486, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais. E-mail: edelfb@mono.icb.ufmg.br. Autor para correspondência.

²Médico Veterinário, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva - Escola de Veterinária - UFMG.

³Médico Veterinário, Professora Assistente, MSc. Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Lavras (UFLA).

⁴Médico Veterinário. Professora Adjunta, MSc, PhD. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária - UFMG.

⁵Médico Veterinário. Professor Adjunto, MSc, PhD. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária - UFMG.

A idade do bezerro à infecção é um importante fator a ser avaliado no estudo da patogênese do rotavírus (DODET *et al.*, 1997, VARSHNEY *et al.*, 1995). Este vírus tem sido associado à diarreia em bezerros jovens, principalmente entre aqueles com até três semanas de vida, podendo estender-se, com uma frequência decrescente, aos animais mais velhos (SNODGRASS *et al.* 1986, CLARK *et al.* 1996).

Nos últimos anos, demonstrou-se a importância epidemiológica e clínica das infecções mistas no complexo diarreia dos bezerros. Entre as associações mais importantes e prevalentes está a do rotavírus com o *Cryptosporidium* spp (BRENNER *et al.* 1993, HALL *et al.* 1988, HALL *et al.* 1994) onde geralmente se observam quadros de diarreia mais graves que os observados em infecções por um só destes agentes. Pouco ainda se conhece sobre a frequência destes agentes em nosso meio, bem como a importância de sua associação.

Este trabalho teve como objetivo a pesquisa da frequência de rotavírus do grupo A em bezerros lactentes no Estado de Minas Gerais e da presença de infecções mistas de rotavírus e *Cryptosporidium* spp.

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste estudo, foram utilizados 194 bezerros com idade variando de dois a 60 dias. Estes animais estavam distribuídos em 33 fazendas, localizadas na bacia leiteira de Pará de Minas, MG. Os rebanhos utilizados eram constituídos de mestiços da raça Holandesa e criados sob condições semelhantes de manejo. Todos os bezerros de dois a 60 dias, de cada propriedade, foram amostrados, sendo que o número médio de bezerros amostrados por fazenda foi de 5,9.

De janeiro a março de 1991, foram coletadas amostras de fezes de cada um dos 194 bezerros. A coleta foi feita diretamente na ampola retal e as fezes, acondicionadas em sacos plásticos, foram transportadas até o laboratório sob refrigeração. A consistência fecal foi classificada em fezes firmes, pastosas, líquidas e semilíquidas, segundo DIRKSEN *et al.* (1993). Fezes líquidas e semilíquidas foram consideradas diarreicas.

A detecção de rotavírus foi feita por um teste de ELISA direto, utilizando anticorpo monoclonal contra rotavírus do grupo A, como descrito por ASHOUR *et al.* (1990). Amostras fecais foram diluídas a 20% em tampão de estabilização para rotavírus (Tris-HCl, 50 mM; CaCl₂, 13 mM; β-mercaptoetanol, 1,5 mM; pH 7,4) e armazenadas a

-20° C até o momento do teste. Todas as amostras foram rediluídas 1:10 em PBS e então testadas no sistema de ELISA para detecção de rotavírus do grupo A.

A detecção de *Cryptosporidium* spp. foi feita pela técnica de Ziehl-Nielsen modificada. A presença de *Cryptosporidium* spp. já havia sido demonstrada nas amostras fecais utilizadas (GARCIA & LIMA, 1994), sendo somente a associação deste agente ao rotavírus explorada no presente trabalho.

RESULTADOS

Das 194 amostras de fezes de bezerros examinadas, 33 (17,0%) foram positivas para rotavírus do grupo A. Do total de amostras testadas (n=294), 103 (53,1%) foram consideradas diarreicas (20 - 10,3% - consistência semilíquida e 83 - 42,8% - consistência líquida) e 91 (46,9%) normais (66 - 34,8% - consistência firme e 25 - 12,9% - consistência pastosa).

Das amostras positivas para rotavírus (n=33), 20 (60,6%) eram diarreicas (4 - 12,1% consistência semilíquida e 16 - 48,5% - consistência líquida) e 13 (39,4%) normais (11 - 33,3% - consistência firme e 2 - 6,1% - consistência pastosa) no momento da coleta.

Na faixa etária de 2 a 7 dias foram testados 14 animais, sendo 2 positivos para rotavírus. Na faixa de 8 a 15 dias, de 30 animais testados 2 foram positivos. Dos 62 animais, de 16 a 30 dias de idade, 8 foram positivos e de 88 animais, com 31 a 60 dias de idade, 21 foram positivos. A distribuição percentual, em faixas etárias dos animais, da população total estudada e dos infectados por rotavírus, pode ser observada na Figura 1.

A presença de diarreia nos bezerros infectados por rotavírus do grupo A e na população estudada é mostrada na Figura 2. Uma maior frequência de diarreia foi encontrada entre os bezerros infectados por rotavírus em todas as faixas etárias, sendo que a totalidade dos bezerros infectados, com até 28 dias de idade, apresentavam diarreia.

Das 33 propriedades amostradas detectou-se a presença de rotavírus em 19 (57,6%).

Dentre todas as amostras examinadas, somente 7 (3,6%) apresentaram simultaneamente rotavírus e *Cryptosporidium* spp. Destes animais, cinco pertenciam à faixa etária de 31 a 60 dias e 2 à faixa etária de 16 a 30 dias. Dos 7 animais com infecção mista, 6 estavam distribuídos em diferentes propriedades e 3 apresentavam diarreia.

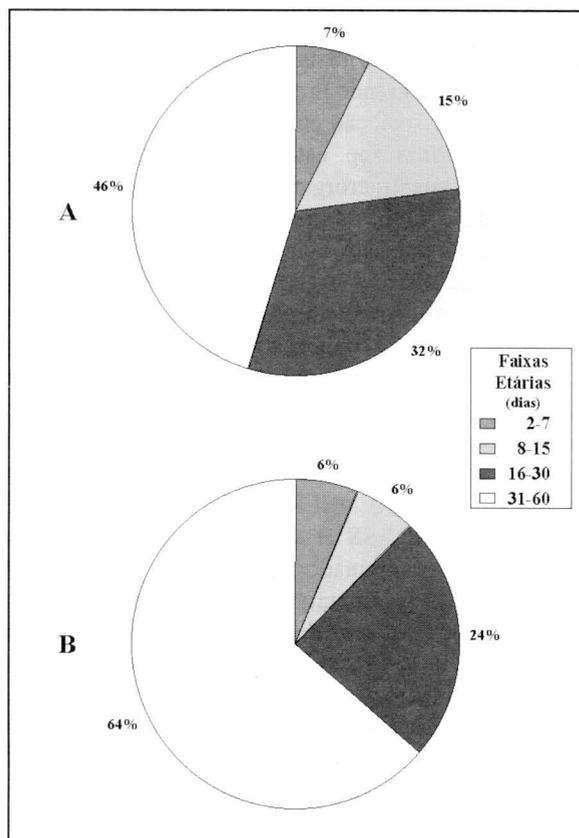


Figura 1 - Distribuição percentual dos animais estudados em cada faixa etária, no total de bezerros examinados (a) e no total de bezerros positivos para rotavírus do grupo A (b).

DISCUSSÃO

Para verificar a presença de rotavírus em bezerros lactentes no Estado de Minas Gerais, foi utilizado o teste de ELISA direto monoclonal contra VP₆ / grupo A, o qual é um teste sensível e específico para a detecção de rotavírus do grupo A (ASHOUR *et al.* 1990). Embora os rotavírus denominados atípicos (não - grupo A) sejam prevalentes em algumas espécies animais como os suínos (MAGAR *et al.*, 1991, MORILLA *et al.*, 1991, JANKE *et al.*, 1990, LIPRANDI *et al.*, 1987) e pequenos ruminantes (MUNOZ *et al.*, 1995), são raramente observados em bovinos (CHASEY & DAVIS, 1984, SAIF, 1990, SNODGRASS *et al.*, 1984, THEIL & McCLOSKEY, 1989). Portanto, a pesquisa da frequência de rotavírus do grupo A é, por si, relevante para o estudo epidemiológico das diarreias em bezerros.

A frequência de rotavírus encontrada nas amostras estudadas foi de 17,0%. Na literatura, os dados relatados sobre a frequência de rotavírus do

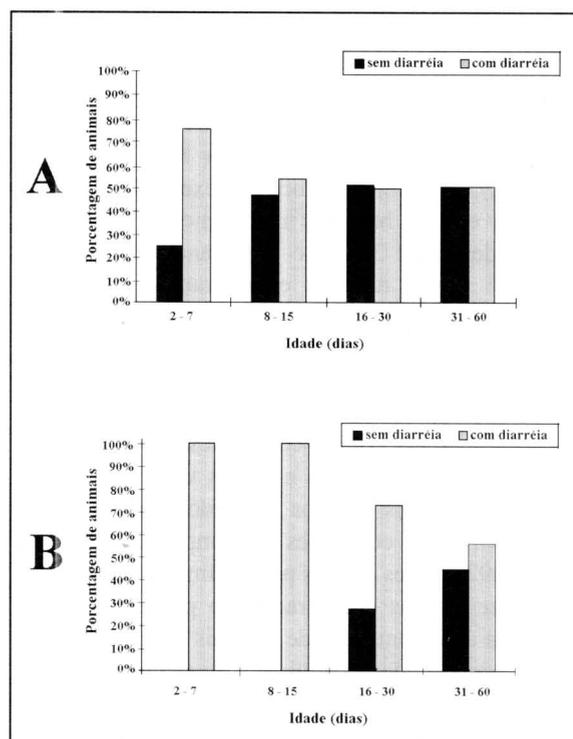


Figura 2 - Distribuição percentual dos animais com e sem diarreia, por faixa etária amostrada, no total de bezerros examinados (a) e nos bezerros positivos para rotavírus do grupo A (b).

grupo A em bezerros são bastante variados. SNODGRASS *et al.* (1980), investigando um surto de diarreia neonatal na Inglaterra, demonstraram que 46% das amostras estudadas eram positivas para rotavírus. BRENNER *et al.* (1993), realizando um levantamento em fezes diarreicas de bezerros, em Israel, encontraram 41,4% de positividade para rotavírus. Em outros trabalhos, onde foram amostrados bezerros com e sem diarreia, a frequência observada de rotavírus do grupo A foi bem mais baixa. ISHIZAKI *et al.* (1995) encontraram 14,7% de fezes positivas para rotavírus. LUCHELLI *et al.* (1992), analisando fezes de 450 bezerros, com idade de 1 a 30 dias, encontraram 16,4% de prevalência para rotavírus. Em um estudo de caso -controle realizado em 300 bezerros de uma propriedade no Canadá, WILSON *et al.* (1992) encontraram apenas 1,3% de bezerros positivos para este vírus. Portanto, a frequência de bezerros portadores de rotavírus do grupo A, observada neste trabalho (17%), está dentro da faixa encontrada por autores que estudaram bezerros com e sem diarreia.

Dos 33 bezerros positivos para rotavírus, 39,4% não apresentavam diarreia. Isso pode ser devido ao tipo de amostragem utilizada. Neste estudo foi realizado apenas uma coleta de fezes por bezerro e estes animais podem ter tido diarreia antes

ou depois da obtenção destas amostras. O teste utilizado para a detecção de rotavírus é muito sensível, podendo detectar pequenas quantidades de vírus, antes ou depois do aparecimento dos sinais clínicos. De fato, um trabalho realizado por REYNOLDS *et al.* (1985), onde foi monitorada a excreção diária de rotavírus em 48 bezerros naturalmente infectados, com idades entre 3 dias e 5 semanas, demonstrou que 83% destes animais excretaram o vírus, em média, por 3,6 dias durante o período de monitoramento; e, 50% dos bezerros infectados não apresentaram sinais clínicos de diarreia durante todo o experimento.

Fatores como taxa de desafio viral, virulência, imunidade passiva e outras variáveis podem amenizar os sinais clínicos induzidos por infecções por rotavírus em condições de campo (LUCHELLI *et al.*, 1992). Esses fatores possivelmente influenciaram os resultados encontrados no presente estudo, nos quais a porcentagem de animais com fezes diarréicas (semilíquidas e líquidas) foi maior no grupo de bezerros positivos para rotavírus, que no grupo de bezerros negativos para o mesmo vírus (Figuras 2a e 2b). É interessante notar que 100% dos animais positivos para rotavírus, com idade inferior a 28 dias, apresentaram diarreia no momento da coleta, comprovando a importância da idade do bezerro à infecção no estudo da rotavirose. Bezerros recém-nascidos possuem lenta reposição de enterócitos, células onde os rotavírus se multiplicam, facilitando a ocorrência do ciclo completo de multiplicação viral e produção de nova progênie para infectar outras células do epitélio intestinal, o que favorece a duração da infecção e lesão das vilosidades intestinais. Em animais mais velhos, há uma competição entre taxa de replicação vírica e a reposição celular; sendo que somente amostras muito virulentas causam diarreia em bezerros acima de 6 semanas de idade (DODET *et al.*, 1997, VARSHNEY *et al.*, 1995).

Oitenta e três (43%) dos bezerros estudados apresentaram diarreia, mas não estavam infectados por rotavírus do grupo A. Deste grupo, 18 (9%) apresentavam *Cryptosporidium* spp. em suas fezes (GARCIA & LIMA 1994). Vários outros patógenos como *E. coli*, *Salmonella* sp e coronavírus também estão associados com diarreia em bezerros de até 60 dias de idade (HALL *et al* 1994, SNODGRASS *et al.*, 1986). A infecção por estes outros enteropatógenos, não pesquisados no presente estudo, bem como problemas na alimentação dos bezerros, podem explicar a presença de diarreia nos animais negativos para os agentes testados.

Na patogenia da diarreia neonatal de bezerros, as infecções mistas têm sido relatadas como frequentes e de grande importância clínica (HALL *et al* 1994). A associação entre rotavírus do grupo A e *Cryptosporidium* spp. está entre as mais importantes. Estes dois microrganismos apresentam maior infectividade na mesma faixa etária em bezerros (15 a 30 dias) e parecem agir sinergicamente na fisiopatologia da diarreia (ANGUS *et al* 1990, HALL *et al* 1994). O rotavírus tem predileção pelo epitélio do jejuno para a sua replicação e o *Cryptosporidium* spp. se multiplica na mucosa do íleo. Portanto, em infecções mistas, o quadro clínico da diarreia pode ser agravado (ANGUS *et al* 1990). Frequências de associação destes agentes de 16,5% a 30,8% já foram relatadas (BRENNER *et al* 1993, HALL *et al* 1988, SNODGRASS *et al* 1980). No entanto, dos 194 bezerros examinados no presente experimento somente 3,6% apresentaram infecção simultânea por rotavírus e *Cryptosporidium* spp., sendo portanto a associação destes patógenos pouco frequente na amostra estudada.

Estes dados mostram que o rotavírus do grupo A é frequente agente de diarreia em bezerros neonatos e que a associação entre este vírus e *Cryptosporidium* spp. não foi relevante na amostra estudada. Este é o primeiro relato de rotavírus do grupo A em bezerros no estado de Minas Gerais.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia (FEP-MVZ) - Coordenação Preventiva pelo apoio financeiro e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas (HCPF e APL).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGUS, K.W. *Cryptosporidiosis of man and animals*. Boca Raton: CRC, 1990. Cryptosporidiosis in ruminants: p. 83-104.
- ASHOUR, A., FERNANDEZ, F.M., RESENDE, M., *et al.* Preparation and characterization of monoclonal antibodies for bovine rotaviruses. *Arq Bras Med Vet Zoot*, v.42, n.6, p.499-509, 1990.
- BARBOSA, E.F., RESENDE, M., RESENDE, J.S., *et al.* Viruses with tri-segmented double-stranded RNA in broiler chicken feces in Brazil. *Arq Bras Med Vet Zoot*, v.44, n.3, p.167-173, 1992.
- BARRAGRY, T.. Calf diarrhoea. *Irish Vet J*, v.50, n.1, p. 49-58, 1997.
- BELLINZONI, R.C., BLACKHALL, J., TERZOLO, H.R., *et al.* Microbiology of diarrhoea in young beef and dairy calves in Argentina. *Vet Argent Microbiol*, v.22, n.3, p. 130-136, 1990.

- BRENNER, J., ELAD, D., MARKOCICS, A., *et al.* Epidemiological study of neonatal calf diarrhoea in Israel - A one-year survey of faecal samples. **Irs J Vet Med**, v.48, 113-116, 1993.
- CHASEY, D., DAVIS, P. Atypical rotaviruses in pigs and cattle. **Vet Rec**, v.114, p.16-17, 1984.
- CLARK, K.J., TAMBORELLO, T.J., ZHICHANG, X., *et al.* An unusual group-A rotavirus associated with an epidemic of diarrhea among three-month-old calves. **J Am Vet Med Assoc**, v.208, n.4: 552-554, 1996.
- DIRKSEN, G., GRUNDER, H.D., STOBBER, M. **Rosenberger exame clínico dos bovinos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p 204-205, 1993.
- DODET, B., HESELTINE, E., MARY, C., *et al.* Rotaviruses in human and veterinary medicine. **Sante**, v.7. n.3, 1997.
- FROIS, M.C.M., MODENA, C.M., VIEGAS, D.M., *et al.* 1994. Tendência histórica dos coeficientes de mortalidade de bezerros em Minas Gerais, 1960 a 1985. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 46, n. 6, p. 741-747, 1994.
- GARCIA, A.M., LIMA, J.D.. Prevalência de *Cryptosporidium* spp. em bezerros leiteiros de Pará de Minas (M.G.) e sua relação com práticas de manejo. **Rev Bras Parasitol**, v. 3, n.1, p. 23-28, 1994.
- GOMES, T.A., RASSI, V., MACDONALD, K.L., *et al.* Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in São Paulo, Brazil. **J Infect Dis**, v.164, n.2, p.331-333, 1991.
- GOUVEIA, A.M.G., NOZAWA, C.M., ARAÚJO, H. Cell culture propagation of rotavirus from feces of diarrheic piglets. **Rev Microbiol**, v.22, n.2, p.108-111, 1991.
- HALL, G.A., REYNOLDS, D.J., PARSONS, K.R., *et al.* Pathology of calves with diarrhoea in southern Britain. **Res Vet Sci**, v.45, p. 240-250, 1988.
- HALL, G.A., JONES, P.W., MORGAN, J.H.. Calf diarrhoea. in: ANDREWS, A.H. (ed.) **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle**. London: Blackwell Scientific. p. 154-180, 1994.
- ISHIZAKI, H., CHIKAKO, O., SHIRAHATA, T., *et al.* Persistence of a single electropherotype and serotype (G6P5) of bovine rotavirus in calves on a closed dairy farm from 1990 to 1993. **Am J Vet Res**, v.56, n.8, p. 1019-1024, 1995.
- JANKE BH, NELSON JK, BENFIELD DA, NELSON EA. Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. **J Vet Diagn Invest**, v.2, p. 308-311, 1990.
- LEITE, R.C., LIMA, J.D. Fatores sanitários que influenciam na criação de bezerros. **Arq Esc Vet UFMG**, v.34, p. 485-492, 1982.
- LIEBLER, E.M., KLUVER, S., POHLENZ, J., *et al.* The significance of bredavirus as a diarrhea agent in calf herds in Lower Saxony. **DTW**, v.99, n.5. p.195-200, 1992.
- LIPRANDI F, GARCIA D, BOTERO L, *et al.* Characterization of rotaviruses isolated from pigs with diarrhoea in Venezuela. **Vet Microbiol**, v.3, n.1, p.35-45, 1987.
- LUCHELLI, A., LANCE, S.E., BARTLET, P.B., *et al.* Prevalence of bovine group-A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **Am J Vet Res**, v.53, n. 2, p. 169-174, 1992.
- MAGAR R, ROBINSON Y, MORIN M. Identification of atypical rotaviruses in outbreaks of preweaning and postweaning diarrhea in Quebec swine herds. **Can J Vet Res**, v.55, p.260-263, 1991.
- MORILLA A, ARRIAGA C, RUIZ A, *et al.* Association between diarrhoea and shedding of group A and atypical groups B to E rotaviruses in suckling pigs. **Ann Rech Vet**, v.22, p.193-200, 1991.
- MUNOZ M, ALVAREZ M, LANZA I, *et al.* An outbreak of diarrhoea associated with atypical rotaviruses in goat kids. **Res Vet Sci**, v.59, p.180-182, 1995.
- REYNOLDS, D.J., HALL, G.A., DEBNEY, T.G., *et al.* Pathology of natural rotavirus infections in clinically normal calves. **Res Vet Sci**, v.38, p. 264-269, 1985.
- SAIF, L.J. Non group A rotaviruses. In: SAIF, L.J., THEIL, K.N., (eds). **Viral Diarrheas of man and animals**. Boca Raton: CRC press., p 73-95, 1990.
- SNODGRASS, D.R.. Cryptosporidia associated with rotavirus and *Escherichia coli* in an outbreak of calf scour. **Vet Rec**, v.106, n.22, p. 458-460, 1980.
- SNODGRASS, D.R., TERZOLO, H.R., SHERWOOD, D.. Aetiology of diarrhea in young calves. **Vet Rec**, v.119, p. 31-34, 1986.
- SNODGRASS, D.R., HERRING, A.J, CAMPBELL I, *et al.* Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. **J Gen Virol**, v.65, p.909-914, 1984.
- THEIL, K.W., McCLOSKEY, C.M. Molecular epidemiology and subgroup determination of bovine group A rotaviruses associated with diarrhea in dairy and beef calves. **J Clin Microbiol**, v.27, n.1, p.126-131, 1989.
- WILSON, J.B., McEWEN, S.A., CLARKE, R.C., *et al.* A case-control study of selected pathogens including verocytotoxigenic *Escherichia coli* in calf diarrhea on an Ontario veal farm. **Can J Vet Res**, v.56, p. 184-188, 1992.