

LUCIANA SIMEONI SCANAVINI

Desenvolvimento de uma Reação em cadeia pela
polimerase para a detecção de coronavírus de
perus (TCOV), por meio de um fragmento da
região S2 de seu genoma

SÃO PAULO

2012

LUCIANA SIMEONI SCANAVINI

**Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela
polimerase para a detecção de coronavírus de
perus (TCOV), por meio de um fragmento da
região S2 de seu genoma**

SÃO PAULO

2012

LUCIANA SIMEONI SCANAVINI

Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase para a detecção de coronavírus de perus (TCOV), por meio de um fragmento da região S2 de seu genoma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento: Patologia


Área de Concentração: Patologia Experimental e Comparada

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.


Conferido Somente Ficha
Catalográfica
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
5/7/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2615
FMVZ

Scanavini, Luciana Simeoni

Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase para a detecção de coronavírus de perus (TCOV), por meio de um fragmento da região S2 de seu genoma / Luciana Simeoni Scanavini. -- 2012.
77 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

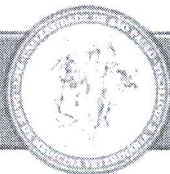
Orientador: Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira.

1. Patologia aviária. 2. Perus. 3. Coronavírus. 4. TCOV. 5. PCR.
I. Título.

ERRATA

SCANAVINI, L.S. **Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase para a detecção de coronavírus de perus (TCOV), por meio de um fragmento da região S2 de seu genoma.** 2012. 63 f. Dissertação (Mestre em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Resumo	1º	63 f.	77 f.
Abstract	1º	63 f.	77 f.

*Comissão de Ética no uso de animais***CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção molecular e diagnóstico diferencial de vírus entéricos em perus comerciais", protocolado sob o nº 1943/2010, utilizando 78 (setenta e oito) amostras de intestino de peru, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/05/2010.

We certify that the Research "Molecular detection of enteric viruses in commercial turkey flocks", protocol number 1943/2010, under the responsibility Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/26/2010.

São Paulo, 27 de maio de 2010

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SCANAVINI, Luciana Simeoni.

Título: Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase para a detecção de coronavírus de perus (TCOV), por meio de um fragmento da região S2 de seu genoma.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

**Ao meu excelentíssimo Marido,
companheiro, cúmplice,
conselheiro e amigo.**

**A minha dedicada Mãezinha, e ao
meu querido Pai, fontes de minha
inspiração.**

**Ao meu filho Gabriel, fonte
das mais desconhecidas
forças de amor...**

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Alto agradeço a oportunidade bendita de trabalho e aprendizado, a inspiração e amparo sempre presentes, e por colocarem pessoas especiais na minha vida, com quem pude compartilhar tantos momentos de alegrias e também tristezas.

Ao Professor Antonio, obrigada pela acolhida no laboratório, pela orientação e participação no trabalho, além dos conselhos e ensinamentos a mim ofertados.

Ao meu marido Marco Aurélio, por ser meu grande e fiel companheiro de jornada, além de principal incentivador em todos os projetos elaborados para a minha vida pessoal e profissional.

Ao meu filhote, que ainda inconsciente de seus grandes atos, incentiva essa mãe de primeira viagem com seu sorriso e sua alegria contagiante.

Aos meus pais, que sempre me serviram de exemplo e me guiaram por toda a vida, transferindo a seus filhos princípios e virtudes que norteiam hoje nossas atitudes e pela presença e suporte dados em todas as tardes quando “tinham” que ficar cuidando do Gabriel para eu poder executar minhas atividades no laboratório ou em casa.

Aos meus sogros, que como meus pais, também me ajudaram a finalizar este trabalho, sempre cuidando de seu neto com tanto carinho e devoção.

Ao Dennis, que encheu o laboratório de alegria com sua chegada! Seja com papéis de paredes inusitados nos computadores do lab, com seu astral sempre pra cima, mesmo em dias de tempestades!! Obrigada pelos altos papos e risadas e, além de tudo isso, obrigada pelo profissionalismo, sempre presente, ajudando a manter o laboratório organizadíssimo e auxiliando-nos também tecnicamente!

Ao Maurício agradeço muito a companhia, a amizade, e os altos papos! Outra peça chave no laboratório, graças a você, temos material pra trabalhar no dia-a-dia e se não temos disponível no momento, você sempre corre pra deixa-los prontinho, assim que possível!

A Claudete, um “poço-sem-fim” de conhecimento, agradeço muito a companhia, o auxílio nas dificuldades do trabalho e nos conselhos, sempre bem-vindos e bem colocados! Tanto profissionalmente, como pessoalmente!

A trupe: Little Lú, Joelma, Márcia, Eugênia, Bin, Carla (já formada), Silvana e ao Luís agradeço demais aos conselhos e trocas de experiência sempre tão importantes pro nosso amadurecimento técnico e pessoal.e principalmente pelas boas horas de convívio, que renderam muitas risadas, lágrimas e mais risadas depois, acompanhado ou não de um bom parmegiana no Japonês, um cachorro- quente perto do COSEAS, um pastel de feira, muitos bandejões, marmitas na copa ou refeições na lanchonete da Vet!!! Vale incluir aqui o Dennis e o Maurício, novamente, os maiores agitadores do almoço!

A Thereza Christina e a Prof. Silvana Gorniak por todo o suporte dado durante e depois da licença-maternidade, junto a CAPES.

Ao Prof. Dr. Mark Jackwood, University of Georgia, Athens, EUA, pelos controles positivos cedidos gentilmente.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aqueles que de alguma forma me auxiliaram ou simplesmente participaram dessa jornada.

São muitas as pessoas que passam por nossas vidas e todas elas contribuem de alguma forma para o nosso aprimoramento! Todos temos algo de bom a oferecer, e a isso, eu serei eternamente grata.

RESUMO

SCANAVINI, L. S. **Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase para a detecção de coronavírus de perus (TCOV), por meio de um fragmento da região S2 de seu genoma.** [Development of a polymerase chain reaction for turkey coronavirus detection (TCOV), by a fragment from the S2 region of its genome]. 2012. 63 f. Dissertação (Mestre em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A partir de amostras de campo de diferentes regiões do país, o TCoV foi identificado em aves de 13-84 dias, em órgãos como intestino, rins e traqueia, por uma reação em cadeia pela polimerase para a região 3' UTR e o gene 3. A presença deste coronavírus nesses diferentes órgãos, que não o intestino, sugere a presença de uma diferente estirpe, com características fenotípicas mais próximas em relação ao vírus da Bronquite Infeciosa das Galinhas (BIG), o IBV. Ao mesmo tempo, um perfil considerando a idade das aves positivas foi desenhado por um teste T de duas amostras, que mostrou maior positividade em aves mais jovens. Com a finalidade de desenvolver um novo ensaio de PCR, várias sequências do TCoV disponíveis no *GenBank* foram alinhadas, um segmento gênico foi desenhado e submetido a diferentes condições de reação. Um fragmento de 436 pb foi obtido, sequenciado e apresentou 100% de identidade quando sua sequência foi comparada a sequência completa do TCoV. A reação mostrou boa repetibilidade, bem como boa reprodutibilidade, e algumas amostras de campo não se apresentaram positivas.

Palavras-chave: Patologia aviária. Perus. Coronavírus. TCoV. PCR.

ABSTRACT

SCANAVINI, L. S. **Development of a polymerase chain reaction for turkey coronavirus detection (TCOV), by a fragment from the S2 region of its genome.** [Desenvolvimento de uma reação em cadeia pela polimerase para a detecção de coronavírus de perus (TCOV), por meio de um fragmento da região S2 de seu genoma]. 2012. 63 f. Dissertação (Mestre em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

TCOV was identified from field samples of birds with 13-84 days, from different regions of the country, and from organs such as intestine, kidneys and trachea, by polymerase chain reaction for 3' UTR region and gene 3. The presence of this coronavirus in these different organs, not intestine, suggest a different strain, with similar phenotype observed in Infectious Bronchitis Virus (IBV). At the same time, a profile considering age of positive birds was designed by a Two sample T-test, which showed higher positivity in younger poults. Several TCOV sequences obtained from GenBank were aligned, and a genic segment was designed and submitted to different conditions in reaction in pursuit to develop a new PCR assay. A 436bp fragment was obtained, sequenced and presented 100% ID when compared to a TCOV complete sequence. The reaction featured good repetition, and reproduction as well, and some field samples did not turn out on positive results.

Keywords: Avian pathology. Turkeys. Coronavirus. TCOV. PCR.

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Evolução da produção brasileira de carne de peru em número de aves abatidas e o retorno financeiro proporcionado pelo mercado externo – Brasil – 2006 / 2008 35
- Gráfico 2 - Análise de regressão das amostras, avaliando a positividade de TCoV, por meio do gene 3' UTR, nos lotes de idades entre 13 – 84 dias. Brasil - 2004 – 2010..... 53

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 - Iniciadores para as reações de *Nested-RT-PCR* para a região 3' UTR e para a reação de RT-PCR para o gene 3..... 43
- Quadro 2 - Sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores e suas respectivas identificações no *GenBank* e referências 45
- Quadro 3 - Sequência dos iniciadores utilizados para a elaboração de teste diagnóstico para o TCoV, para a detecção de sua região S1..... 46
- Quadro 4 - Iniciadores, sequências, e valores mínimos de Identidade Máxima (ID), máximo *e-Value* (valor esperado) quando comparados à todas as sequências completas do vírus, porção S a qual se refere e tamanho de produto esperado..... 54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Distribuição da produção Mundial de perus. O Brasil aparece em 6º lugar - 2004 34
- Tabela 2 - Evolução da produção brasileira em número de aves abatidas, quantidade em toneladas (t) produzidas para o mercado interno (MI) e para o mercado externo (ME) e rendimento em dólares (US\$ ME) com a comercialização do produto exportado. A taxa de crescimento média do período foi de 7,43% - Brasil, 2003 – 2011 34
- Tabela 3 - Quantidade de RNA extraído disponível proveniente das amostras extraídas de TCOV impregnados em cartão FTA, em diferentes concentrações: duplamente concentrada (2X), padrão (1X) e diluída 1:2 (1/2 X) - São Paulo – 2010 48
- Tabela 4 - Distribuição dos resultados da PCR para o gene 3' UTR entre os órgãos analisados – Brasil – 2004 - 2010 51
- Tabela 5 - Resultados de P-value da avaliação de prevalência nos órgãos estudados, utilizando o Teste T para duas amostras: amostras estatisticamente iguais ($p > 0,05$) – Brasil – 2004 – 2010..... 52
- Tabela 6 - Produtos da reação de amplificação, em pares de bases (pb), do primeiro ensaio de gradiente de temperaturas para a pesquisa do gene S2 do TCoV – São Paulo – Julho 2011 56
- Tabela 7 - Tamanho de produto observado, em pares de base, resultante das

reações de PCR em diferentes temperaturas de hibridização, com material genético extraído utilizado em diferentes concentrações – São Paulo – Dez 2010	59
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Produção mundial de Perus em toneladas (t). Brasil no grupo de maiores produtores – FAO - 2004..... 33
- Figura 2 - Estrutura típica de um coronavírus e suas proteínas estruturais. 38
- Figura 3 - Esquema da organização estrutural do genoma do coronavírus de perus (TCoV), baseado nos estudos de Gomaa *et al.* (2008). 39
- Figura 4 Eletroforese de ensaio realizado utilizando os iniciadores TCOV SF e
Figura 4 - TCOV SR (esquerda) e S810 F e S810 R (direita)..... 55
- Figura 5 - Eletroforeses dos produtos amplificados de PCR realizadas com diferentes temperaturas de hibridização (Ta), utilizando o oligonucleotídeo S810 R2 como iniciador reverso e material genético extraído de controle positivo em diferentes concentrações..... 59
- Figura 6 - Valores encontrados para a identidade e escore em análise da sequência em *BLASTn*..... 60
- Figura 7 - Eletroforese com produtos obtidos das reações de amostras de campo: padrão idêntico ao do controle positivo em uma das amostras e produtos de tamanho similar ao da banda de interesse 61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
1.1	OBJETIVOS	36
2	REVISÃO DE LITERATURA	37
3	MATERIAL E MÉTODO	41
3.1	AMOSTRAS DE CAMPO.....	41
3.2	PREPARO DAS AMOSTRAS	41
3.3	TESTES DAS AMOSTRAS	43
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3.5	DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA O GENE S	45
3.6	PADRONIZAÇÃO E REAÇÃO DE PCR PARA O GENE S2	46
3.7	PURIFICAÇÃO DO DNA OBTIDO NA REAÇÃO DE PCR	49
3.8	SEQUENCIAMENTOS DOS PRODUTOS DE PCR	49
3.9	ANÁLISE E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS	50
4	RESULTADOS	51
4.1	TESTES PARA A REGIÃO 3'UTR NAS AMOSTRAS DE CAMPO	51
4.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4.3	DESENHO DOS INICIADORES PARA O GENE S	53
4.4	PADRONIZAÇÃO	54
4.5	SEQUENCIAMENTO	60
4.6	DETECÇÃO DO GENE S2 NAS AMOSTRAS DE CAMPO	61
5	DISCUSSÃO	63

6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1/2 X	Amostra diluída 1:2
1X	Concentração padrão
2X	Duplamente concentrado
BIG	Bronquite Infecciosa das Galinhas
cDNA	DNA complementar
F A S	<i>Foreign Agriculture Service</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
IBV	Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (<i>Infectious Bronchitis virus</i>)
LABOR	Laboratório de Ornitopatologia
ME	Mercado Externo
MI	Mercado Interno
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEMS	<i>Poult Enteritis Mortality Syndrome</i>
RT	Transcriptase Reversa (<i>Reverse transcriptase</i>)
RT-PCR	Reação em cadeia pela Polimerase com transcrição reversa (<i>Polymerase chain reaction with reverse transcriptase reaction</i>)
T _a	Temperatura de hibridização
TCoV	Coronavírus de perus (<i>Turkey Coronavirus</i>)
UBA	União Brasileira de Avicultura
USA	<i>United States of America</i>
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
USP	Universidade de São Paulo
UTR	Região não traduzida (<i>Untranslated Region</i>)
DIM	Dímero

LISTA DE SÍMBOLOS

m	Metro
nm	Nanometro
b	Base
μ	Micro
l	Litro
g	Gramma
ng	Nanograma
M	Molar
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
V	Volts
pb	Par de base
U	Unidades
=	Igual
>	Maior

1 INTRODUÇÃO

A produção de perus no Brasil mostrou um grande aumento desde o início da última década, impulsionado pelo aumento da demanda tanto no mercado interno como nas exportações dos produtos dessa ave e incluindo o país no grupo dos maiores produtores dessa carne (Figura 1). No período de 2003 a 2008, o número de aves abatidas cresceu aproximadamente 58,6%, fechando este último ano com 45.605.578 aves abatidas, seguido de uma queda de aproximadamente 29,83%, entre 2008 e 2010. Com esses números, o Brasil, que ocupava o sexto lugar na produção mundial em 2004 (FAO), em 2012 foi classificado como o segundo maior produtor mundial, o segundo exportador e o segundo maior consumidor dessa ave (Tabelas 1 e 2; USDA-FAS, 2012).

Figura 1 – Produção mundial de Perus em toneladas (t). Brasil no grupo de maiores produtores – FAO - 2004

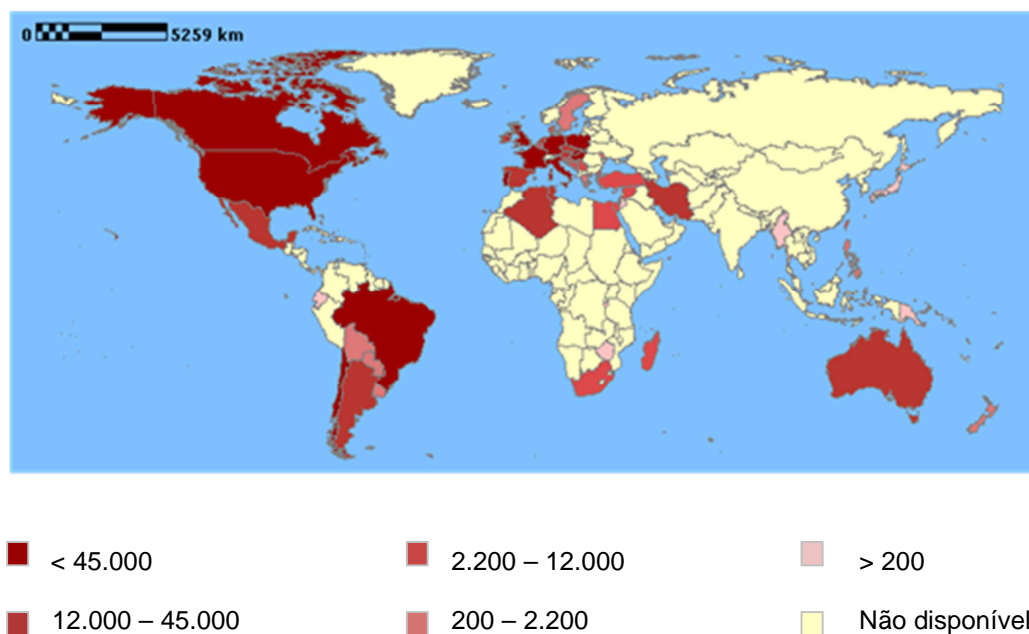


Tabela 1 – Distribuição da produção Mundial de perus. O Brasil aparece em 6º lugar - 2004

País	Produção (t)	País	Produção (t)
USA	2.414.000	Israel	129.000
França	625.000	Hungria	90.000
Itália	340.000	Eslováquia	72.000
Alemanha	310.000	Chile	67.000
Reino Unido	230.000	Polônia	50.000
Brasil	220.000	Portugal	45.000
Canadá	145.000		

Fonte: FAO, 2004

Tabela 2 – Evolução da produção brasileira em número de aves abatidas, quantidade em toneladas (t) produzidas para o mercado interno (MI) e para o mercado externo (ME) e rendimento em dólares (US\$ ME) com a comercialização do produto exportado. A taxa de crescimento média do período foi de 7,43% - Brasil, 2003 – 2011

Ano	Aves Abatidas	t total	t MI	t ME	US\$ ME (000)
2003	28.752.672	271.439	161.044	110.395	152,288 *
2004	34.950.239	314.526	180.211	134.315	212,371
2005	36.911.194	359.236	198.565	160.671	256,755
2006	35.649.842	353.278	197.222	156.056	262,820
2007	40.421.024	458.087	280.757	177.330	390,289
2008	45.605.578	465.000	260.749	204.251	557,904
2009	44.110.455	466.000	302.426	163.574	381,778
2010	32.000.000	485.000	327.180	157.820	424,498
2011**	-	505.000	504.860	140.000	-

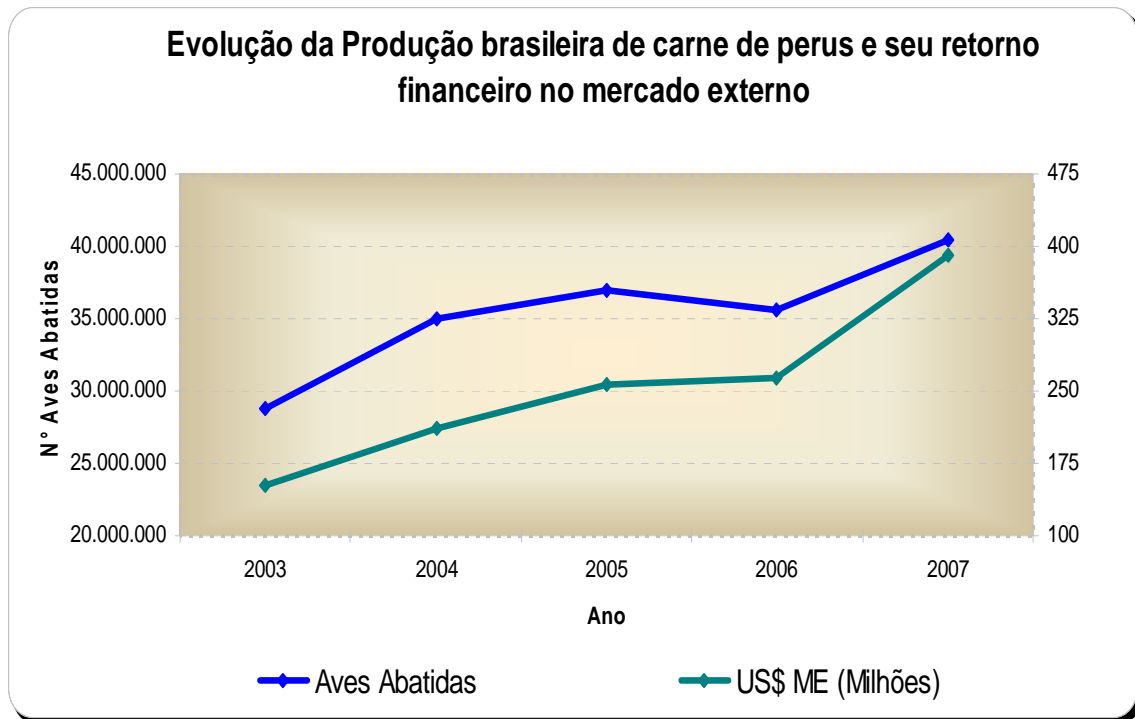
Fonte : UBA, 2008; *UBA, 2006; **

USDA, 2012.

A redução em número de aves abatidas, observada na tabela 2, é consequência da introdução da linhagem Nicholas, cuja genética permitiu uma melhor conversão alimentar e, conseqüentemente aumentou o peso por ave ao abate. Esse dado se confirma ao se analisar a quantidade de carne produzida em toneladas no mesmo período, que aumentou 71,3%. Além disso, o gráfico 1 e a tabela 2 mostram a valorização do preço dessa carne no mercado internacional: embora tenha ocorrido uma diminuição no número de aves abatidas, o faturamento somente com o mercado externo aumentou.

No país, a criação se concentra nas regiões sul e sudeste, nos estados de Santa Catarina (Chapecó), Paraná (Francisco Beltrão), Minas Gerais (Uberlândia) e Goiás (Mineiros) (UBA, 2008).

Gráfico 1 – Evolução da produção brasileira de carne de peru em número de aves abatidas e o retorno financeiro proporcionado pelo mercado externo – Brasil – 2006 / 2008



Considerando o aumento da produção, é imprescindível que a cadeia produtiva se torne melhor para a aquisição de ganhos em taxa de conversão alimentar, ganho de peso das aves, uniformidade do lote, bem como para diminuir a taxa de mortalidade no campo. Na criação de perus, as aves são submetidas a grandes desafios, mas paulatinamente informações científicas apresentadas na forma de trabalhos publicados vêm aumentando e colaborando com esta criação animal.

No Brasil, o coronavírus foi relatado apenas duas vezes. Foi isolado de amostras de perus que apresentavam sintomas da Síndrome da Mortalidade Entérica das Aves (PEMS – *Poult Enteritis-Mortality Syndrome*) na região sudeste, em 2006 (VILLARREAL et al., 2006) e novamente relatado em 2007 (TEIXEIRA et al., 2007). A partir desses dois relatos, outros trabalhos foram realizados, em busca

de um diagnóstico rápido e eficiente, aplicável a realidade brasileira (BUNGER et al., 2009; CARDOSO et al., 2008, CARDOSO et al., 2010).

A doença pode se manifestar como enterite viral ou o vírus pode se tornar um dos agentes da síndrome da mortalidade entérica dos perus, que é um processo patológico com a participação de diferentes agentes etiológicos, como, por exemplo, astrovírus (ISMAIL; TANG; SAIF, 2003) e bactérias oportunistas como *E. coli*. O coronavírus é um vírus que causa alta morbidade e já foi responsável por 23% das perdas nos plantéis do estado americano de Minnessota, em 1966 (NAGARAJA; POMEROY, 1997).

1.1 OBJETIVOS

Frente a essa realidade, do contexto nacional, esse trabalho teve como objetivos:

- Detectar pela reação de PCR, usando um segmento gênico da região 3'UTR, a presença de coronavírus de perus em diferentes órgãos de aves com sintomatologia clínica.
- Verificar a presença do gene 3 do coronavírus de perus pela reação de PCR, em diferentes órgãos de aves com sintomatologia clínica.
- Elaborar um novo protocolo de detecção do TCoV, utilizando o método de reação em cadeia pela polimerase, reconhecendo-o pelo gene S.

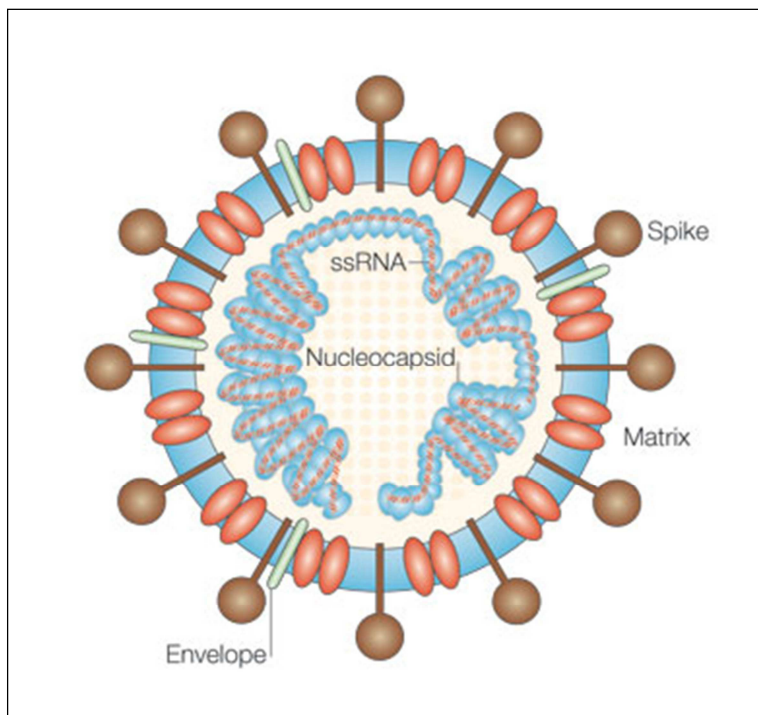
2 REVISÃO DE LITERATURA

Da ordem *Nidovirales*, o coronavírus é um vírus envelopado de tamanho entre 50 e 200nm, com projeções em sua superfície que conferem um aspecto de coroa (NAGARAJA; POMEROY, 1997). Possui como material genético uma fita simples de RNA, com senso positivo, não segmentado e linear (GUY, 2003), seu tamanho, 27 a 30 Kb é o maior entre os vírus de RNA (SPAAN; CAVANAGH; HORZINEK, 1988). A classificação atual apresenta três grupos (I, II e III), de acordo com a semelhança antigênica, sendo que o coronavírus de perus se insere no Grupo III, junto ao vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (BIG) (GUY, 2000; GOMAA et al., 2008). Existe uma nova proposta de classificação, na qual, o TCoV seria inserido dentro da subfamília *Coronavirinae*, e do grupo Gamacoronavírus, junto aos outros vírus aviários (DE GROOT et al., 2008; WOO et al., 2009).

Apesar da doença *apresentar* grande importância econômica e ser conhecida há mais de meio século, estudos para o entendimento de sua estrutura genética iniciaram com Gomaa et al. (2008) e aumentaram consideravelmente nos últimos quatro (04) anos.

Os coronavírus possuem em sua estrutura quatro proteínas que são fundamentais no processo infeccioso (Figura 2). A proteína M, uma proteína de membrana do vírus, determina o local onde as fases iniciais de desenvolvimento do vírion irão ocorrer dentro da célula. A proteína N, proteína do nucleocapsídeo, está envolvida na replicação do RNA viral. Uma vez inativada, a síntese de RNA genômico é inibida em até 90% (SPAAN; CAVANAGH; HORZINEK, 1988). A proteína E, uma proteína do envelope, participa da formação do envoltório viral e mantém a sua integridade (VENNEMA et al., 1996).

Figura 2 – Estrutura típica de um coronavírus e suas proteínas estruturais.



Fonte: Dandekar, AA; Perlman, S. (2005).

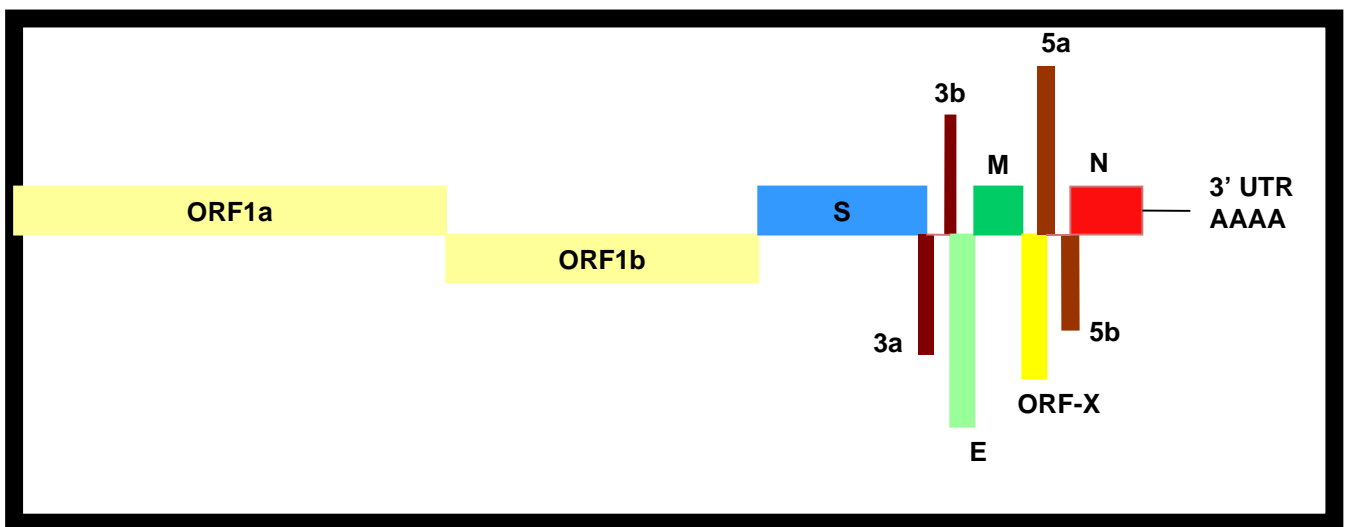
A proteína S (*Spike*) possui duas porções, S1 e S2, nos coronavírus dos grupos 2 e 3, sendo que a região S1 abriga uma porção hipervariável do genoma, que confere ao vírus a capacidade de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (COLLINS et al., 1982), enquanto a S2 a ancora na cápsula (MAUREL et al., 2011).

Juntas, as regiões S1 e S2 formam os prolongamentos da cápsula que conferem ao vírus o aspecto de coroa. Essa proteína é responsável pela adesão celular do vírus, uma vez que, quando comparados ao vírus de IBV em diferentes densidades, aqueles com menor densidade mostraram uma capacidade de infectar células 10 vezes menor que aqueles com densidade maior. Essa diferença de densidade ocorreu pela variação de até 20 a 30% na quantidade de polipeptídeos da porção S (CAVANAGH, 1981).

O TCoV, como os outros coronavírus, possui em sua estrutura genética (Figura 3) duas unidades de ORFs (*Open Reading Frames*), ORF1a e ORF1b, que ocupam dois terços da porção inicial (5') do genoma, e estão envolvidos no processamento de poliproteínas, na replicação genômica e na síntese de RNA sub-

genômico, enquanto no terço final, se concentram os genes que codificam as proteínas estruturais S, 3a, 3b, E, M, 5a, 5b, N e a porção 3' UTR (GOMAA et al., 2008).

Figura 3 – Esquema da organização estrutural do genoma do coronavírus de perus (TCoV), baseado nos estudos de Gomaa et al. (2008).



Uma vez infectadas, as aves passam por um período de incubação de dois (02) a três (03) dias (GUY, 2003), tempo suficiente para o vírus se instalar nas células intestinais (enterócitos) do jejuno e íleo, e também nas células epiteliais foliculares e interfoliculares da bursa de Fabricius (GUY et al., 1997) onde se replicam no citoplasma e obtêm suas cápsulas a partir da membrana do retículo endoplasmático e do aparato de Golgi (POMEROY et al., 1978). Esse processo ocorre tanto em embriões, como em perus jovens e adultos.

Os sinais clínicos demonstrados são depressão, anorexia, desidratação, diarreia aquosa, de coloração verde a marrom, e pode conter muco e urato. Esses sinais podem ser decorrentes da destruição das células apicais dos vilos intestinais, e da alteração da função fisiológica do enterócito (POMEROY et al., 1978), bem como da microbiota intestinal local.

Conseqüentemente, o animal perde peso e o produtor perde na conversão alimentar pela má absorção e digestão alimentar, e também na uniformidade do lote. Dessa forma, a falta de uniformidade do lote causa impacto no processo do

frigorífico, podendo acarretar em perdas durante todas as fases do processo (insensibilização, escaldagem, depenagem, evisceração), que possuem parâmetros regulados de acordo com o tamanho e peso da ave. Assim, quanto maior a desuniformidade, maior o número de perus com hematomas por uma insensibilização ineficaz, com excesso de escaldagem pela temperatura de tanque inadequada, além de outros defeitos adquiridos, como fraturas e outras perdas nas demais etapas do processo do abatedouro.

A intensidade dos sinais clínicos da enterite pode variar com a associação de outros fatores, como a idade do lote, condições sanitárias das instalações, infecções secundárias e clima (GUY, 2003), que contribuem para a incidência de alta mortalidade das aves. Como o vírus é eliminado pelas fezes, a transmissão ocorre pela ingestão das próprias fezes ou de outros fômites contaminados. Pode existir distribuição mecânica do vírus por meio de veículos, botas e até mesmo outros animais, como roedores, aves silvestres e insetos.

Não existe tratamento efetivo. As aves, após a infecção, adquirem resistência ao vírus, entretanto não existem vacinas específicas disponíveis no mercado.

A estrutura do vírus não está totalmente elucidada, e isto dificulta o estabelecimento de medidas de controle eficaz (GOMAA et al., 2008). Medidas básicas de biossegurança como banhos, troca de roupa e calçado entre um núcleo e outro, restrição a entrada de visitantes, principalmente aqueles que têm contato com outras aves, e realização de vazio sanitário, são de grande auxílio, posto que o vírus pode permanecer no ambiente por um longo período e contaminar diferentes lotes, no mesmo aviário (NAGAJARA; POMEROY, 1997).

Como os sinais de enterite podem ser causados por diferentes agentes etiológicos, entre bactérias, vírus e protozoário, torna-se necessário o uso de métodos de diagnóstico auxiliares, dentre estes a técnica da Transcriptase Reversa da Reação em Cadeia pela Polimerase (RT-PCR). Outros métodos como a microscopia eletrônica e a Imunohistoquímica também podem ser utilizados (GUY, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo estão descritas as metodologias experimentadas e adotadas durante a execução do presente estudo.

3.1 AMOSTRAS DE CAMPO

As amostras provenientes das regiões produtoras consistiram em aves inteiras, ou órgãos dessas aves (intestino com fezes, bursa de Fabrício, rins, pulmão, traqueia), que apresentaram diarreia líquida, anorexia, desidratação, perda de peso e desempenho nas primeiras cinco (05) semanas de vida.

As aves inteiras foram acondicionadas em sacos plásticos, assim como as vísceras, estas separadas por tipo (intestino ou bursa de Fabrício), e no máximo em cinco (05) unidades por saco, pertencentes ao mesmo lote, e devidamente identificados com a idade, o sexo, o número do lote e do núcleo de produção, bem como a data da coleta.

As amostras foram encaminhadas em isopor, com gelo, para o Laboratório de Ornitopatologia (LABOR), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), na cidade de São Paulo.

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Suspensões foram preparadas coletando 700 μ L ou aproximadamente 700 μ g das fezes e/ou dos órgãos macerados, a estas se adicionou solução tampão de fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,4 em um microtubo de modo que o volume final fosse 1mL. Em seguida, essas amostras passaram por um processo de três fases: homogeneização em *vortex* por 1 minuto, descanso em congelador a -80°C por 10 minutos e banho-maria a 56°C por 1 minuto, sendo essa sequência repetida por três

vezes. Finalmente, as suspensões foram clarificadas a 12000 x g/ 30 minutos, a 4°C, e 250µL do sobrenadante foi recolhido para posterior extração.

O preparo do controle positivo, encaminhado em cartão FTA, obedeceu ao seguinte protocolo:

1 – Cinco (05) fragmentos de aproximadamente 2mm² foram recortados do cartão impregnado com material coletado de ovos inoculados com TCoV, cepa TCOV/TX-1038/98 (JACKWOOD et al., 2010), e colocados em um microtubo.

2 – 250µL de tampão Tris HCl-EDTA, pH 8,0 (TE) foram adicionados ao microtubo, que foi homogeneizado em *vortex* por 20 segundos.

3 – A mistura foi incubada a temperatura ambiente, por 30 minutos e destinada em seguida para a extração do material genético.

O RNA das amostras encaminhadas foi extraído pelo método GIT modificado (CHOMZINSKY; SACCHI, 1987): 250µL da suspensão de amostra foram adicionados a um microtubo (Axygen[®]) contendo 500µL de Isotiocianato de Guanidina, 500µL de fenol pH 4,0, 50µL de acetato de sódio 2M, pH 4,0, 4µL de betamercaptoetanol, agitados em *vortex* por 20 segundos e incubadas por cinco (05) minutos à temperatura ambiente (15 a 30°C) para promover a desnaturação do RNA e inibição de ribonucleases. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio-álcool isoamílico, na proporção de 24:1, agitadas novamente em *vortex* por 20 segundos e deixadas a temperatura de geladeira (5 a 8°C), por 15 minutos.

Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, por 20 minutos, a 4°C. O volume de 700µL do sobrenadante, contendo o ácido ribonucléico isolado, foi transferido para um novo tubo, contendo 750µL de Isopropanol. Após um descanso de 20 minutos, a temperatura de -20°C, as amostras foram novamente centrifugadas a 12000 x g, por 15 minutos, a 4°C, para a precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado com 1mL de etanol 75%, também desprezado após a centrifugação a 12.000 x g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco, virando os microtubos em papel absorvente por 10 minutos. Em seguida, o RNA foi dissolvido em 20µL de água DPEC e incubado por 10 minutos em placa aquecida a 56°C.

Como controle negativo se utilizou água ultrapura esterilizada.

3.3 TESTES DAS AMOSTRAS

As amostras foram submetidas a detecção da região 3' não traduzida do genoma (3'UTR) por meio de uma reação de *Nested* – RT – PCR, conforme descrito por Cavanagh et al. (2002), assim como, a detecção do gene 3 do coronavírus de perus (BUNGER et al., 2009) e a detecção do gene S2, com *primer* desenhado para esse gene no presente estudo.

O RNA extraído foi submetido a uma reação de transcrição reversa, para a produção de DNA complementar (cDNA), utilizando a enzima transcriptase reversa MMLV (Invitrogen) e os iniciadores específicos para cada reação (Quadro 1). As reações de transcrição foram todas realizadas a 45°C, por 1h, seguidos de 10 minutos, a 72°C.

Quadro 1 – Iniciadores para as reações de *Nested*-RT-PCR para a região 3' UTR e para a reação de RT-PCR para o gene 3

<i>Iniciador</i>	<i>Sequência (5'-3')</i>	<i>Região</i>
UTR 41	ATG TCT ATC GCC AGG GAA ATG TC	3'UTR
UTR 11	GCT CTA ACT CTA TAC TAG CCT A	3'UTR'
UTR 31	GGG CGT CCA AGT GCT GTA CCC	3'UTR'
PS4+	TGA GTA AGT GTG GTA AGA AAT C	Gene 3
PM4-	CAA AAG CAC CAT AAC ACT ATC AT	Gene 3

Em seguida, o cDNA foi adicionado ao *mix* do PCR, que era composto de tampão 10X isento de magnésio, *mix* contendo 1,25mM de cada uma das bases nucleotídeas, 0,625µL de cada um dos *primers* (UTR 41 e UTR 11) na concentração de 10pM/µL, 0,375µL de magnésio 50mM e Taq DNA polimerase (1,25U), todos fornecidos no *kit* de reagentes Taq DNA *Polymerase* (InvitrogenTM), totalizando uma mistura de 45µL, que foi submetida ao ciclo de 94°C por 1 minuto, seguido por 48°C, por 1 minuto e meio, e 2 minutos a 72°C, repetidos por 30 vezes.

Para finalizar esta etapa, o produto de 266 pb do cDNA amplificado foi adicionado a uma nova mistura, contendo os *primers* UTR 41 e UTR 31 e a enzima

Taq DNA Polimerase (reação de *Nested*) nas mesmas concentrações, somando novamente 45µL de reação e submetida ao mesmo ciclo utilizado na reação de PCR.

Para verificar o resultado, o material genético amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1,5%, no qual as amostras coradas com o corante Blue Green[®] (LGC) foram depositadas em poços, e posteriormente submetidas a uma corrente elétrica na proporção de 10V por cm de gel de corrida. Para a comparação das bandas, em um dos poços formados no gel, foi depositado um marcador de peso molecular de 100 pb. O resultado foi analisado por meio de um transiluminador e foto documentado por celular Nokia XpressMusic 5800, com lente Carl Zeiss, abertura de 2.8/ 3.7 e resolução de 3.2 *megapixel* e por *Alpha Imager Mini Analysis System* (Alpha Innotech).

As amostras positivas para o gene 3' UTR foram selecionadas e submetidas à pesquisa do gene 3, específicos para o vírus TCoV, conforme descrito por Bunger et al. (2009).

Para essa reação, as condições de transcrição reversa foram idênticas as descritas anteriormente, com a exceção dos iniciadores utilizados, PS4+ para a sequência senso e PM4- para a anti senso. Em seguida, o cDNA foi submetido a uma reação em cadeia pela polimerase, utilizando o *kit* Taq DNA *Polymerase* (Invitrogen[™]), composta por 5µL de tampão 10X, 8µL da mistura de bases nucleotídeas (dNTP) na concentração de 10mM, 1,5µL de cada iniciador na concentração de 10pM/ µL, 2µL de magnésio a 50mM, 1,25U de enzima Taq DNA polimerase. As condições de eletroforese, bem como a leitura de seu resultado foram idênticas às descritas anteriormente.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados iniciais foram analisados estatisticamente utilizando o programa Minitab 16 para a avaliação da prevalência nos órgãos analisados, por meio do teste T para duas (02) amostras, com intervalo de confiança de 95%, e o teste de regressão com *fitted-line plot* para se avaliar a incidência da doença de acordo com a idade dos lotes estudados.

3.5 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS PARA O GENE S

Foram selecionadas oito (08) sequências completas do TCoV (quadro 2), em formato FASTA, publicadas no *GenBank* (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*) que foram alinhadas no *software BioEdit Sequence Alignment Editor* (HALL, 1999) utilizando a ferramenta *ClustalW Multiple Alignments*. Em seguida, foi criada uma sequência consenso, utilizando a ferramenta *Alignment - Create Consensus Sequence*.

Quadro 2 – Sequências utilizadas para o desenho dos iniciadores e suas respectivas identificações no *GenBank* e referências

Estirpe de TCoV	Identificação <i>GenBank</i>	Referência
TCOV <i>Complete Genome</i> . Referência	NC010800.1	Gomaa et al, 2008.
TCOV – 540	EU022525.1	Cao, J. et al, 2008
TCOV – ATCC	EU022526.1	Cao, J. et al, 2008
TCOV/IN-517/94	GQ427175.1	Jackwood, et al, 2010
MG10	EU095850.1	Gomaa et al, 2008
TCOV/ TX-1038/98	GQ427176.1	Jackwood, et al, 2010
TCOV/VA-74/03	GQ427173.1	Jackwood, et al, 2010
TCOV/TX-GL/01	GQ427174.1	Jackwood, et al, 2010

A partir da sequência alinhada, foram selecionados os fragmentos mais conservados presentes nas posições referentes ao gene S, tanto para a porção S1, quanto para a porção S2. Em seguida, a sequência selecionada foi inserida no software *Oligo Perfect™ Designer* (Life Technologies™), que originou pares de iniciadores, analisados em BLAST, para se verificar sua acurácia e especificidade para o organismo pesquisado.

3.6 PADRONIZAÇÃO E REAÇÃO DE PCR PARA O GENE S2

Inicialmente, foram utilizados um par de iniciadores destinado a detecção da porção S1, TCOV SR e TCOV SF, desenhados da mesma forma como descrito no item 4.5, com a expectativa de um produto com tamanho de 590 pares de bases. A reação foi composta de reagentes do *kit Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™). O volume de 2,0µL de cDNA, 2,5µL de tampão 10X, 4µL de dNTP 1,25mM, 1,50µL de cada iniciador senso e anti senso (Quadro 3), 1µL de cloreto de magnésio 50 mM, 0,25µL de enzima *Platinum_{Taq}* e água ultra pura q.s.p foram utilizados para uma mistura de 25µL de reação. Esta foi submetida a temperatura de desnaturação inicial a 95°C, por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C, por 30 segundos, 55°C, por 30 segundos e 72°C, por 1 minuto, finalizando com uma etapa de 10 minutos para a extensão final.

Quadro 3 – Sequência dos iniciadores utilizados para a elaboração de teste diagnóstico para o TCoV, para a detecção de sua região S1¹

Nome do iniciador	Sequência (5'- 3')
TCOV SF	CTT GYA CAR MCA TAC CAG AGT ATG C
TCOV SR	TGT GCC AAC ACA CTG YGC YAA CCA

1 – Desenho realizado e não publicado por Jorge Luis Chacòn Villanueva.

Um ensaio foi realizado utilizando os iniciadores para a região S1 e S2, nas mesmas condições descritas acima e, como controles da reação, se utilizou três (03) amostras de campo, a cepa vacinal H120 (Fort Dodge[®]) para a diferenciação do coronavírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas, e água ultra pura como controle negativo.

A elaboração de uma reação de PCR para o gene S2 se iniciou com um gradiente de temperatura para a etapa de hibridização, que variou de 49,1°C até 58,9°C, com duração de 1 minuto. As demais temperaturas foram fixadas em 94°C, por 3 minutos para a etapa de desnaturação inicial, 40 ciclos de 94°C, por 1 minuto, a hibridização, anteriormente descrita, e extensão a 72°C, por 2 minutos. Para finalizar, extensão final a 72°C, por 10 minutos. As reações foram estocadas em freezer, a -20°C, até a realização da eletroforese.

Em uma primeira etapa foram utilizadas três (03) amostras de campo e, na segunda etapa de ensaios, um controle positivo conhecido da variante TX1038/98 (JACKWOOD et al., 2010), proveniente da inoculação de ovos embrionados, após a 10^a passagem, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mark Jackwood da University of Georgia, Athens, GA, USA.

Na segunda etapa, vários parâmetros foram testados como: a) a extração pelo método de *Trizol* (Life Technologies[™]), que foi realizada conforme as orientações do fabricante; b) diferentes concentrações de material genético extraídos pelo método de GIT, sendo usada a concentração padrão, duas vezes concentradas (2X) e a extração diluída em 50% (½X); c) o iniciador reverso S810 R foi modificado em uma de suas bases, sendo substituída a segunda “Adenina” por uma “Guanina”, e renomeado de S810 R2 (Quadro 4, item 5.3).

Essa alteração foi realizada dado que a região de origem desse *primer* possui essa mutação entre as oito estirpes selecionadas, sendo que a sequência referência, MG-10 (GOMAA et al., 2008), TCOV/IN-517/94, TCOV/ TX-1038/98 e TCOV/VA-74/03 (JACKWOOD et al., 2010) apresentam essa mutação, ou seja, a base “Guanina”, ao contrário das demais estirpes TCOV/TX-GL/01 (JACKWOOD et al., 2010), TCOV-ATCC e TCOV-540 (CAO et al.; 2008). Para esse ensaio, o material genético extraído foi quantificado em espectrofotômetro Biophotometer[®] (Eppendorf), apontando as concentrações de 179ng/ µL na concentração padrão (1X), 412ng/ µL na extração duplamente concentrada (2X), e 131ng/ µL na diluição em 50% (½X) (Tabela 3).

Tabela 3 – Quantidade de RNA extraído disponível proveniente das amostras extraídas de TCOV impregnados em cartão FTA, em diferentes concentrações: duplamente concentrada (2X), padrão (1X) e diluída 1:2 (1/2 X) - São Paulo – 2010

Amostra	RNA (ng/ μ L)
TX 10P (2X)	412
TX 10P (1X)	179
TX 10P (1/2 X)	131

A concentração de reagentes da reação de PCR utilizada foi a mesma para todas as situações. Para tanto, foi utilizado o *kit Platinum[®] Taq DNA Polymerase* (Invitrogen[™]) sendo 2,5 μ L de cDNA, 2,5 μ L de tampão 10X, 4 μ L de dNTP 1,25mM, 0,75 μ L de cada iniciador senso e anti senso, 1 μ L de cloreto de magnésio a 50mM, 0,25 μ L de enzima *Platinum_{Taq}* e água ultra pura q.s.p para uma mistura de 25 μ L de reação.

A eletroforese foi realizada como descrita anteriormente no item 4.2, sendo o tamanho do produto esperado de 357 pares de bases.

Após estabelecer a temperatura de hibridização, na terceira etapa foi pesquisado a quantidade ideal de cloreto de magnésio, sendo realizado seis ensaios contendo as mesmas concentrações de reagentes acima, exceto o cloreto de magnésio 50mM, que foi adicionado nas quantidades de 1 μ L, 0,9 μ L, 0,85 μ L, 0,80 μ L e 0,75 μ L. As condições de temperaturas, as quais as reações foram submetidas, foram as mesmas dos ensaios anteriores, exceto a temperatura de hibridização, fixada em 56,8°C.

Por fim, foram realizados dois ensaios para a quantidade de DNTP com as quantidades de 3,75 μ L e 3,5 μ L do *pool* de bases a 1,25mM, respectivamente.

3.7 PURIFICAÇÃO DO DNA OBTIDO NA REAÇÃO DE PCR

Os fragmentos correspondentes aos genes da porção S2 foram purificados dos géis de agarose 1,5% com o *kit* GFX PCR DNA *and* Gel PurificationTM (GE Healthcare Life Sciences). A banda foi cortada após sua visualização por meio de um transiluminador de lâmpada UV e transferidas para um microtubo anteriormente pesados. Após determinar o peso líquido da fração de gel cortado, foi adicionado o tampão de captura do *kit*, na proporção de 10µL para cada 10mg e o microtubo incubado em banho seco a 60°C, por 15 minutos, sendo agitado a cada 5 minutos.

Após a completa dissolução do gel, o volume total foi completado até 600µL, quando aplicável. A mistura foi homogeneizada e o volume total, transferido para os microtubos coletores, e incubados por 1 minuto, a 60°C, seguido de centrifugação a 13.000 rpm (rotor F45-30-11, Eppendorf), em temperatura ambiente. Após nova incubação e centrifugação, os tubos coletores foram transferidos de microtubo e, em seguida, adicionados 10 a 50µL de tampão de eluição aquecido por 10 segundos em micro-ondas. O volume variou de acordo com a intensidade da banda: quanto mais fraca a banda, menos eluente.

Após nova incubação a 60°C, por 1 minuto, e centrifugação a 13.000 rpm (rotor F45-30-11, Eppendorf) por 2 minutos em temperatura ambiente, o tubo coletor foi descartado e do volume total de DNA purificado, 9µL de amostra foram quantificados visualmente com *Low Mass DNA Ladder* (InvitrogenTM) em uma nova eletroforese em gel de agarose 2%, e encaminhadas para o preparo da reação de sequenciamento, quando apresentaram pelo menos 20ng/µL.

3.8 SEQUENCIAMENTOS DOS PRODUTOS DE PCR

A reação de sequenciamento foi realizada pelo Serviço de Sequenciamento do Laboratório Genoma (Faculdade de Biociências – USP), com as amostras previamente preparadas conforme o protocolo fornecido pela equipe.

Os iniciadores foram diluídos na hora do uso em água ultra pura, na concentração de 5 μ M, e foram misturados 2,5 μ L dessa diluição a 5 μ L do produto de PCR purificado, na concentração mínima de 20 η g/ μ L.

A reação foi composta dessa mistura adicionada aos reagentes do *kit BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle* (Life Science Technologies[™]), sendo 2 μ L de *BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix*, 1 μ L de *BigDye[®] Terminator v3.1 5X Sequencing Buffer*, 3 μ L da mistura de iniciadores, o produto de PCR e 4 μ L de água ultra pura e submetidas a 96°C, por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 96°C, por 10 segundos, 50°C, por 5 segundos e 60° C por 4 minutos, com rampa de 1°C por segundo, entre as temperaturas.

3.9 ANÁLISE E EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

Os cromatogramas gerados foram analisados manualmente por meio do *freeware Chromas Lite* (216kb) *Version 2.01* (Technelysium[®]), em busca de alterações ou discrepâncias potencialmente produzidas na primeira leitura. As sequências senso e reverso-complemento da anti senso, então editadas, foram transferidas para o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999), no qual foram alinhadas e originada uma sequência consenso. Finalmente, sua identidade foi confirmada na ferramenta *BLASTn* (NCBI) comparando-a com a sequência referência do genoma do coronavírus de perus NC010800.1.

4 RESULTADOS

As páginas seguintes descrevem os resultados obtidos durante a execução do presente estudo.

4.1 TESTES PARA A REGIÃO 3'UTR NAS AMOSTRAS DE CAMPO

Foram recebidas e analisadas 94 amostras de campo, sendo 52 com origem em trato entérico, 19 de pulmões, três (03) de rins e 19 de traqueias. Destas, 47 apresentaram produtos de 179 pb na reação de PCR para o gene 3' UTR, sendo 34 deles oriundos de trato entérico (Intestino com fezes), cinco (05) de pulmões, três (03) de rins e cinco (05) de traqueia (Tabela 4). Para o gene 3, 22 apresentaram produto de 912 pb, todos em amostras do trato entérico.

Tabela 4 – Distribuição dos resultados da PCR para o gene 3' UTR entre os órgãos analisados – Brasil – 2004 - 2010

Órgão	Negativo	Positivo	Total Geral
Intestino	18	34	52
Pulmão	14	5	19
Rins	0	3	3
Traqueia	14	5	19
Total Geral	47	47	94

4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

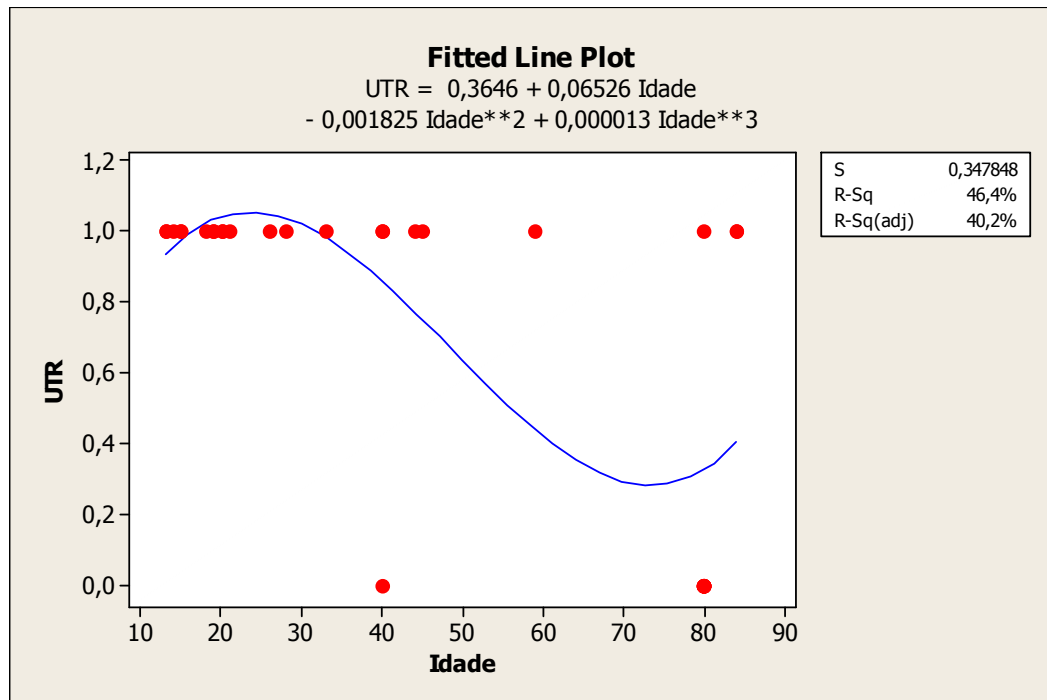
Na amostragem utilizada para o estudo, com relação a prevalência nos tipos de órgãos, não houve diferença estatística. Usando o teste T, ao se comparar os pares pulmão – intestino, traqueia – intestino, foi encontrado o valor de $p=0,982$ e as amostras foram consideradas iguais, enquanto as amostras de traqueia e pulmão foram consideradas absolutamente idênticas estatisticamente, uma vez que $p=1,0$ (Tabela 5). As amostras de rim foram desconsideradas na avaliação devido ao baixo número ($n = 3$) presente no grupo.

Tabela 5 – Resultados de *P*-value da avaliação de prevalência nos órgãos estudados, utilizando o Teste T para duas amostras: amostras estatisticamente iguais ($p>0,05$) – Brasil – 2004 – 2010

Órgãos	Intestino	Pulmão	Rim	Traqueia
Intestino	-	0,982	ND	0,982
Pulmão	0,982	-	ND	1,000
Rim	ND	ND	-	ND
Traqueia	0,982	1,000	ND	-

A segunda análise realizada se baseou na influência da idade (em dias = d) dos lotes de aves, das amostras recebidas, que abrangia o intervalo de 13 a 84 dias. Os *outliers* ($d>84$) foram excluídos para possibilitar a melhor visualização da distribuição desses resultados em uma análise de regressão, que resultou em uma equação polinomial “ $UTR = 0,3646 + 0,06526d - 0,001825d^2 + 0,000013d^3$ ” (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Análise de regressão das amostras, avaliando a positividade de TCoV, por meio do gene 3' UTR, nos lotes de idades entre 13 – 84 dias. Brasil - 2004 – 2010



4.3 DESENHO DOS INICIADORES PARA O GENE S

Do alinhamento de oito sequências, as cinco (05) regiões mais conservadas foram selecionadas para originarem iniciadores, das quais foram selecionadas duas (02) para a padronização, que apresentaram baixos valores esperados (*E-value*), 100% de identidade com as sequências de origem (Quadro 4). O par denominado S810 amplificou um fragmento da região S2, cujo tamanho esperado era de 357 pb. O par S227 foi desenhado para amplificar a região S1, com tamanho esperado de 150 pares de bases.

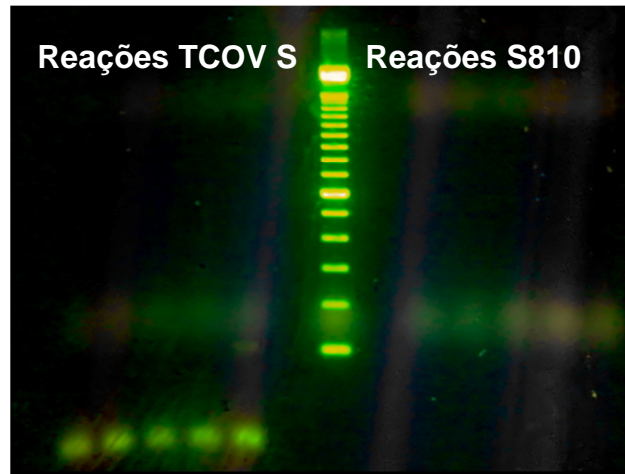
Quadro 4 – Iniciadores, sequências, e valores mínimos de Identidade Máxima (ID), máximo *e-Value* (valor esperado) quando comparados à todas as sequências completas do vírus, porção S a qual se refere e tamanho de produto esperado.

Iniciador	Sequência (5' - 3')	ID(%)	<i>E-Value</i>	Porção S	Produto
S810 F	TTA CTG CAA TAT GCG GAA GC	100	2.10^{-6}	S2	357pb
S810 R	CAA GCG CCA TAC CAC CTA TT	100	3.10^{-5}	S2	
S810 R2	CGA GCG CCA TAC CAC CTA TT	100	3.10^{-5}	S2	
S227 F1	CAC TTG CAG ACG GTG GTC TA	100	2,0	S1	150 pb
S227 R5	GCA GGA ACA AAC AAG CCT ACA	100	2.10^{-4}	S1	

4.4 PADRONIZAÇÃO

No teste inicial, com os *primers* TCOV SF e TCOV SR, não houve a produção de produtos de tamanho esperado, mas um rastro ao final da corrida, indicando restos de reagentes. Ao repetir o ensaio, em comparação com os iniciadores para a região S2 (S810 F e S810 R), os restos de reagentes continuaram presentes, e houve a produção de uma banda inespecífica de 100 pb, enquanto na reação de detecção da porção do S2, não houve qualquer fluorescência emitida (Figura 4).

Figura 4 – Eletroforese de ensaio realizado utilizando os iniciadores TCOV SF e TCOV SR (esquerda) e S810 F e S810 R (direita)



No primeiro teste de gradiente de temperatura de hibridização (T_a), utilizando as amostras de campo como o DNA-base para a reação em cadeia pela polimerase, foram observados produtos de aproximadamente 500 pares de bases entre as temperaturas de 49,8°C e 53,1°C, diversos produtos, cujo tamanho variou de 100 a 400 pb na temperatura de 55,7°C e um fragmento de 600 pb na temperatura de 57,8°C, para a amostra 239-2. A amostra 239-3 apresentou uma banda de 500 pb com a T_a de 49,1°C, que não se repetiu nas demais T_a , 100 e 200 pb para as temperaturas de 49,8°C, 51,8°C, 53,1°C e 57,8°C e 100 e 150 pb, a 54,4°C e 56,8°C. A amostra 239-4 produziu fragmentos somente em duas temperaturas diferentes, sendo o primeiro de 500 pb, a 49,3°C e três (0)3 fragmentos distintos de 320, 400 e 600 pb, a 54,4°C. Não ocorreu amplificação com a vacina H120, ou seja, com o controle de IBV (Tabela 6).

Tabela 6 – Produtos da reação de amplificação, em pares de bases (pb), do primeiro ensaio de gradiente de temperaturas para a pesquisa do gene S2 do TCoV – São Paulo – Julho 2011

(continua)

Amostras	Temperaturas (°C)											
	49,1	49,3	49,8	50,7	51,8	53,1	54,4	55,7	56,8	57,8	58,5	58,9
Controle Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
239-2	-	-	500	500	500	500	-	100	600	-	-	-
								150				
								300				
								350				
								400				
239-3	500	-	100	-	100	100	100	-	100	100	-	-
			200		200	200	150		150	200		
239-4	-	500	-	-	-	-	320	-	-	-	-	-
							400					
							600					

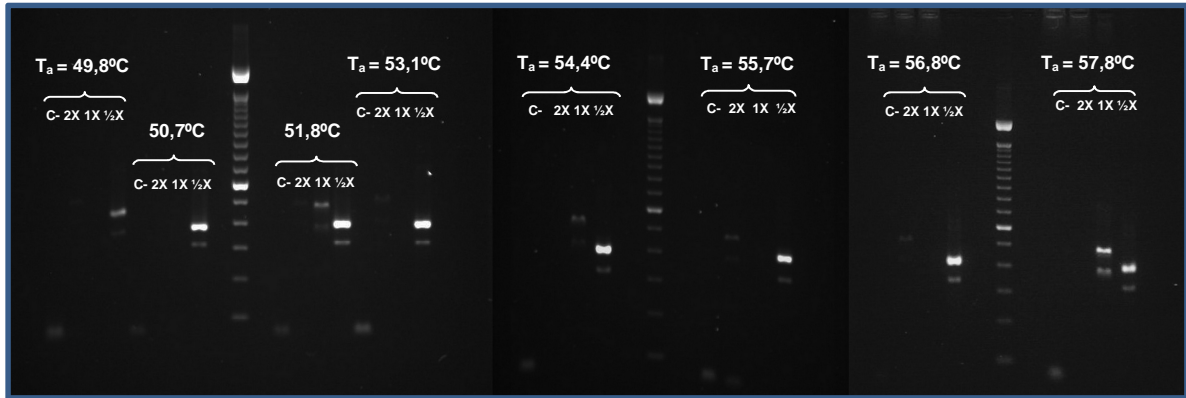
Apesar de exibir reprodução dos resultados mostrados nas amostras 239-2 e 239-4, o sequenciamento mostrou que os fragmentos obtidos eram inespecíficos. Neste ensaio, a dificuldade se mostrou presente frente a inexistência de um controle positivo, posteriormente cedido pelo Prof. Dr. Mark Jackwood (University of Georgia, Athens, USA).

Na segunda etapa dos testes de gradiente de concentração, já de posse de tais controles, não foram obtidos resultados expressivos no primeiro ensaio. Assim, modificações foram realizadas no protocolo de extração. No segundo ensaio, a reação novamente não proporcionou resultados satisfatórios, ao passo que algumas bandas se apresentaram em 4 das 20 reações, em diferentes temperaturas e diluições e com diferentes tamanhos, indicando inespecificidade.

Frente a estes resultados, os iniciadores foram mais uma vez analisados, e foi observado que o iniciador anti senso S810 R possuía sequência de bases com 100% de identidade somente com o genoma das estirpes TCoV TX-GL/01 (JACKWOOD et al., 2010), TCoV – ATCC e TCoV-540 (CAO; WU; LIN, 2008). Assim, um outro iniciador foi sintetizado, alterando-se a base que sofreu a mutação, conforme descrito no item 3.6.

Para o terceiro ensaio, os resultados obtidos foram aqueles dispostos na tabela 7, e além de repetibilidade, o ensaio demonstrou reprodutibilidade em seus resultados. Não houve a presença de diferentes bandas e nem variação na quantidade de produtos produzidos conforme a temperatura de hibridização, mas sim de acordo com a concentração do material genético utilizado. Nas reações realizadas com o RNA extraído com o dobro de concentração do controle positivo (2X), não houve emissão de fluorescência ou, quando houve, apresentou banda de 500 pares de bases e outra em 400 pares de bases, sendo ambas consideradas muito fracas. O mesmo ocorreu para as reações de concentração padrão (1X), enquanto que em todas as reações realizadas com o RNA extraído com a metade da concentração de material extraído ($\frac{1}{2}X$) as bandas apresentadas eram muito fortes para todas as temperaturas testadas, e o tamanho observado bem próximo ao esperado (357 pb), ou seja, de 390 pares de base e 315 pares de bases (Figura 5).

Figura 5 – Eletroforeses dos produtos amplificados de PCR realizadas com diferentes temperaturas de hibridização (T_a), utilizando o oligonucleotídeo S810 R2 como iniciador reverso e material genético extraído de controle positivo em diferentes concentrações.



As amostras foram dispostas no gel de agarose 1,5% priorizando a temperatura de hibridização, assim, o padrão de resultado se refere as amostras na seguinte ordem: controle negativo, TX 10P (2X), TX10P (1X), TX 10P (1/2X), e se repete para cada temperatura (Figura 5).

Tabela 7 – Tamanho de produto observado, em pares de base, resultante das reações de PCR em diferentes temperaturas de hibridização, com material genético extraído utilizado em diferentes concentrações – São Paulo – Dez 2010

Temperatura (°C)	49,8	50,7	51,8	53,1	54,4	55,7	56,8	57,8
Amostra								
Controle Negativo	Dim ¹	Dim	Dim	Dim	Dim	Dim	-	Dim
TX 10P (2X)	500	-	500	500	-	500 400	-	-
TX 10P (1X)	-	-	500 400	-	500 400	-	-	500 400
TX 10P (1/2X)	450 380	390 315	390 315	390 315	400 320	390 315	410 350	390 320

¹Dim = dímero

Os ensaios com diferentes concentrações de magnésio mostraram que com a quantidade de 0,80µL de cloreto de magnésio a 50mM ocorreu uma diminuição do número de bandas inespecíficas. Os ensaios com diferentes quantidades de *pool* de DNTPs, não mostraram qualquer variação na intensidade dos produtos nas reações de PCR.

4.5 SEQUENCIAMENTO

A banda de 390 pb resultou em um sequenciamento de um segmento 436 nucleotídeos que mostrou identidade de 100% com a sequência referencia NC. 010800 (GOMAA et al, 2008), porém de baixo escore, quando submetida para a comparação e análise em BLASTn (Figura 6), pois apresentou um *E-value* de 1,5, escore máximo de 22,9 nucleotídeos e apenas 11% de alinhamento com a sequência do genoma completo de TCoV. O outro fragmento de 250 pares de bases, não apresentou nenhuma sequência similar.

Figura 6 – Valores encontrados para a identidade e escore em análise da sequência em *BLASTn*

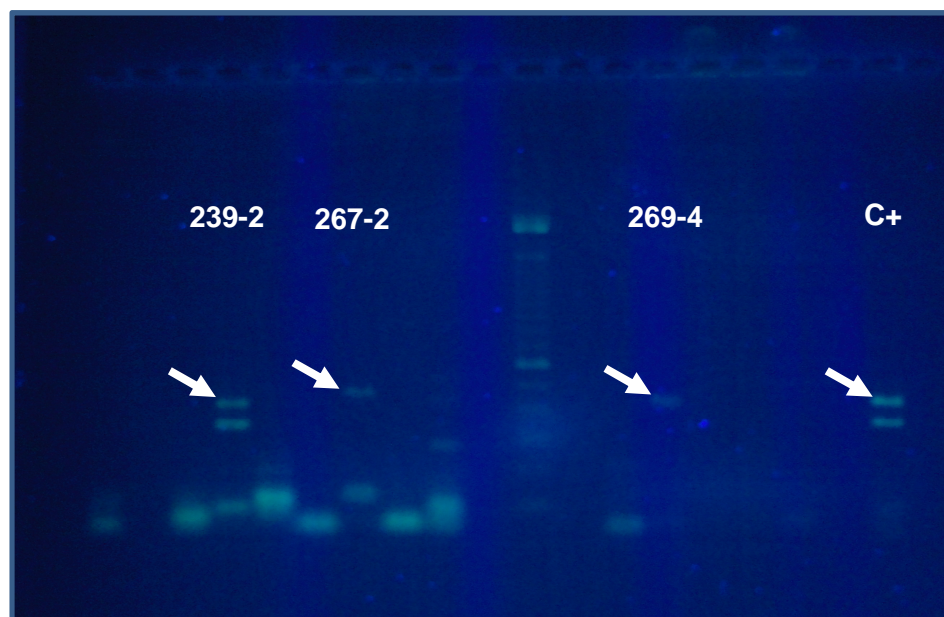
Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	<u>Max score</u>	<u>Total score</u>	<u>Query coverage</u>	<u>E value</u>	<u>Max ident</u>
NC_010800.1	Turkey coronavirus, complete genome	22,9	109	11%	1,5	100%

Fonte: NCBI – BLASTn

4.6 DETECÇÃO DO GENE S2 NAS AMOSTRAS DE CAMPO

Ao testar o par de *primers* com as amostras de campo, a reação produziu bandas inespecíficas, além daquela de interesse (Figura 7). Foram realizados três (03) ensaios, na tentativa de purificar este fragmento a partir do gel de agarose 1,5%, porém não foi possível recuperar a quantidade suficiente de material genético para a reação de sequenciamento.

Figura 7 – Eletroforese com produtos obtidos das reações de amostras de campo: padrão idêntico ao do controle positivo em uma das amostras e produtos de tamanho similar ao da banda de interesse.



5 DISCUSSÃO

O trabalho se iniciou identificando as amostras que continham partículas presentes de TCoV a partir dos iniciadores da região 3' UTR e aqueles desenhados para o gene 3 (CAVANAGH et al., 2001; CAVANAGH et al., 2002). Dentre as amostras de campo analisadas, 50% foram positivas na pesquisa do gene 3' UTR, e 23,40% apresentaram o produto do gene 3, resultado proporcional ao encontrado por Bunger (2009), que sugeriu a possibilidade de falha na hibridização dos iniciadores PS4+ e PM4- com as diferentes estirpes presentes no campo brasileiro, uma vez que muitos dos resultados positivos para o gene 3' UTR não se confirmaram para o gene 3.

Ao se estratificar os resultados do primeiro gene analisado pelos órgãos de origem, foi observado positividade em amostras provenientes de pulmão e rins. Uma vez que as publicações anteriores relatavam que o tropismo do TCoV é exclusivamente entérico (GUY et al., 1997; GUY, 2003), os resultados encontrados neste estudo poderiam ser atribuídos a uma possível contaminação durante a necropsia, seja por ruptura da mucosa intestinal, que se torna mais delgada devido a destruição dos enterócitos (POMEROY et al., 1978; YU et al, 2000) ou por descuido durante a retirada do trato digestório, uma vez que as amostras de trato entérico dessas mesmas aves foram também positivas. Por outro lado, a presença identificada de um coronavírus em traqueia de perus é intrigante, pois as amostras intestinais destas aves resultaram em testes negativos.

Dessa forma, talvez o coronavírus de perus possa se comportar de forma semelhante ao vírus da bronquite infecciosa (IBV), uma que em galinhas, o IBV possui tropismo para o trato respiratório, replicando-se nas células ciliares presentes na traqueia destas aves, e também possui a capacidade de infectar rins e trato reprodutivo, causando lesões nesses órgãos e diminuindo drasticamente a produção de ovos (CAVANAGH; GELB, 2008).

Pesquisando o gene 3, conservado não só em TCoV, mas também em IBV e coronavírus de faisão (CAVANAGH et al., 2001), as cinco (05) amostras de traqueia, do total de 19 não produziram qualquer produto. É improvável que tenha ocorrido contaminação, pois as amostras de intestino com fezes do mesmo grupo de aves resultaram em testes negativos para a detecção de TCoV 3' UTR. Uma hipótese

seria a de que o limite de detecção dessa reação é maior, e exige então, uma maior quantidade de material genético presente na amostra para, enfim, originar uma reação positiva (GOODWIN et al., 1995; HOORFAR; COOK, 2003). Para tanto, seria necessário replicar esse material em ovo embrionado (CAVANAGH et al., 2002, ISMAIL; TANG; SAIF, 2003; GOMES et al., 2010; JACKWOOD et al., 2010), por 3-4 passagens, ou mais, até que os embriões mostrem lesões como aumento de tamanho do intestino (YU et al., 2000), a fim de aumentar a concentração desse vírus, se ele estiver ainda viável na amostra.

Ao comparar o histórico dos perus acometidos e investigados, pouco foi descrito sobre esses órgãos. O desempenho de postura não foi possível analisar pela idade precoce, uma vez que esse animal entra em idade reprodutiva com 29 semanas, bem após a idade de maior incidência da doença, e, apesar do diagnóstico positivo por um teste validado, detectando-se o gene 3' UTR (CAVANAGH et al., 2001), não foram relatados sinais respiratórios para os animais investigados. Vale ressaltar, que na criação de perus, a presença de espirro é bastante comum, sendo este sinal muitas vezes ignorado pelos produtores brasileiros, que o relatam somente quando o quadro de lesões é severo.

Apesar de não existirem trabalhos com maior ênfase na pesquisa de uma possível interferência do TCoV em diferentes órgãos, além do trato intestinal, estudos comprovam uma relação genética próxima do TCoV ao IBV (CAVANAGH et al., 2001) e o surgimento de novas estirpes oriundo da recombinação de outros coronavírus que, então, podem ter se adaptado em diferentes espécies (WOO et al., 2009; JACKWOOD et al., 2010, HUGHES, 2011).

Alguns autores inferem que a taxa de substituições homólogas do coronavírus varia de 1/1.000 a 1/10.000 para cada nucleotídeo durante a replicação do vírus, por ano (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008; JENKINS et al., 2002). Jackwood et al. (2010) observaram que entre 30-52 passagens por ovos embrionados, oito (08) mutações ocorreram, sendo que quatro (04) se tornaram fixas, três (03) foram revertidas e uma (01) delas ocorreu na região S1, a qual apresenta aproximadamente 35% de similaridade com o IBV, e por ser responsável pela adesão celular, pode definir seu tropismo e seu hospedeiro. Dessa forma, estas informações poderiam explicar uma possível adaptação evolutiva na estirpe brasileira, diferente do padrão comum observado nos demais coronavírus de perus.

Em outro aspecto, a dispersão dos lotes positivos em relação à idade (gráfico 2) mostrou a predisposição para a infecção em lotes mais jovens, de até 21 dias de vida. Guy (2003) descreveu o aparecimento de sintomas como diarreia, anorexia, diminuição de crescimento, disfunção imunológica e alta mortalidade entre 1 - 4 semanas de vida do lote, e Goodwin et al. (1995) ressaltou que existe uma maior incidência para essas manifestações clínicas entre 11-18 dias de idade. Os mesmos sinais foram relatados em surtos ocorridos nos EUA (BROWN; GARCIA; KELLEY, 1997; GOODWIN et al., 1995; CARVER et al., 2001) e na Europa (CAVANAGH et al., 2001; DOMANSKA-BLICHARZ et al., 2010; MAUREL et al., 2011).

Uma vez detectadas as amostras positivas, estas foram testadas com os iniciadores pré-desenhados e degenerados (TCOV SF e TCOV SR). No entanto, estas não produziram qualquer fragmento, e muitas vezes, apresentaram pequenos produtos, de tamanho próximo ou inferior a 100 pb. Ao analisar os iniciadores nas sequências alinhadas, verificou-se a ausência da sequência do oligonucleotídeo em reverso complemento. Isso pode ter ocorrido pelo fato destes iniciadores terem sido desenhados anteriormente à publicação da primeira sequência completa (GOMAA et al., 2008) ou das sequências de glicoproteínas da região S para o coronavírus de perus (JACKWOOD et al., 2009: GQ469646.1; GQ469645.1; GQ469643.1; GQ469644.1). O uso de oligonucleotídeos com degenerações é indicado quando há pouca informação sobre o organismo pesquisado, e para tanto, as informações de base utilizadas são aquelas disponíveis para organismos que apresentem boa similaridade (RAPLEY, 1998), neste caso, as sequências disponíveis de IBV.

Para as reações utilizando o par de iniciadores senso e anti senso S810, inicialmente não houve qualquer fluorescência emitida na eletroforese (Figura 4). Uma vez que esses primeiros resultados poderiam ser decorrentes da ausência de hibridização dos iniciadores com o material genético disponível devido à diferença de temperatura utilizada (55°C), em relação a temperatura de "melting" dos iniciadores, de 62°C (RYCHLIK; SPENCER; RHOADS, 1990; O'CONNEL, 2002).

Ainda considerando as características do teste da primeira etapa, outra possibilidade seria que os 35 ciclos utilizados para os passos de desnaturação, hibridização e extensão tenham sido insuficientes para a produção de uma quantidade mínima de produtos capaz de emitir fluorescência na eletroforese, mesmo que este número estivesse dentro do intervalo de 25-40 ciclos recomendados para a execução da reação (RAPLEY, 1998).

No segundo ensaio, ainda realizados a partir de amostras de campo, alguns produtos foram observados com a amostra 239-2, e embora tenha apresentado um padrão de repetição, a reação de sequenciamento não recuperou informações consistentes.

Inicialmente, o cromatograma gerado foi considerado inespecífico, porém, o tamanho do produto de até três (03) vezes acima do tamanho esperado e o excesso de ruído pode significar que a reação não funcionou (NUCLEICS, 2012), e pode ter acontecido por diferentes razões: a baixa qualidade do DNA ou excesso do mesmo, o iniciador utilizado na reação de PCR pode não funcionar bem na temperatura da reação de sequenciamento, geralmente realizada em 70°C (RAPLEY, 1998).

Para excluir a possibilidade dos iniciadores não estarem alinhando corretamente com o RNA presente, estes foram mais uma vez analisados e foi observado que o anti senso S810 R possuía sequência de bases com 100% de identidade somente com o genoma das estirpes TCoV TX-GL/01 (JACKWOOD et al., 2010), TCoV – ATCC e TCoV-540 (CAO et al., 2008), e se diferenciava das outras quatro (04) estirpes por uma mutação de Adenina para Guanina.

Após a confecção de um novo iniciador reverso contendo a Guanina, os resultados do terceiro ensaio mostraram boa repetibilidade na produção das bandas e a reação obteve resultados melhores na maior diluição do RNA extraído, sugerindo que a concentração próxima de 100ng/ µL é melhor para um maior desempenho da reação.

Estudos mostraram que o desempenho da reação se relaciona com a quantidade de RNA utilizado. Chandler; Wagnon; Bolton (1997) e Suslov; Steindler (2005) consideraram que a baixa quantidade de cDNA proveniente da reação da transcriptase reversa pode inibir a reação, enquanto Guatelli; Gingeras; Richman (1989) descreveram que uma alta concentração do material genético alvo diminui a eficiência da amplificação. Além disso, Demeke e Jenkins (2010) abordaram que uma diluição do material extraído também afetava outros possíveis inibidores da reação e que poderiam estar presentes. Na quantificação do RNA nas amostras deste estudo, o fenol foi identificado pelo valor de absorvância a 230nm, e de fato, o menor valor foi observado na amostra mais diluída.

Apesar de todas as tentativas, não foi possível eliminar a menor banda, de aproximadamente 315 pb. Isso ocorreu talvez pelo número de ciclos, que poderiam favorecer uma ligação indesejada dos iniciadores dentro dos próprios fragmentos

formados, originando um produto parcial que se replicaria exponencialmente por conter uma região de ligação para ambos os oligonucleotídeos utilizados (GUATELLI; GINGERAS; RICHMAN, 1989).

O sequenciamento realizado a partir do produto da reação do controle positivo confirmou a reprodutibilidade de um fragmento do genoma de TCoV, que apresentou 100% de identidade, um valor esperado (*E-value*) de 1,5 que pode indicar um alinhamento significativo, apesar de existir uma probabilidade de aproximadamente 0,7% de ocorrer um alinhamento ao acaso, pois este ocorreu com uma sequência pequena de apenas 436 pb. O resultado do alinhamento de apenas 11% da amostra sequenciada com o genoma completo do vírus TCoV e baixo escore (22,9 nucleotídeos) indicam a presença de grandes GAPs ou um grande número destes, mesmo que seus intervalos sejam curtos. Dessa forma, esse dado pode indicar que a similaridade entre a sequência submetida e a referência para TCoV foi baixa. Por outro lado, o tamanho do fragmento submetido foi de 436 pb, enquanto o genoma completo do vírus apresenta 27657 pb (GOMAA et al., 2008), uma diferença de tamanho consideravelmente grande, e que pode refletir nestes valores apresentados pelo BLASTn.

A reação com esse par de iniciadores funcionou, uma vez que o padrão de bandas apresentadas na eletroforese para algumas amostras de campo são idênticas aquelas originadas do controle positivo, proveniente de um vírus TCoV variante (JACKWOOD et al., 2010) e dessa forma, este resultado sugere que esta estirpe viral esteja presente no Brasil.

Considerando as informações da literatura que demonstraram a alta taxa de mutação e recombinação do coronavírus (JENKINS et al., 2002; DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008; JACKWOOD et al. 2010), que algumas amostras de campo foram negativas na detecção pelo gene S2, mas que se apresentaram positivas em outras reações de PCR utilizadas (3' UTR e gene 3) e que o vírus foi detectado em diferentes órgãos é possível que exista mais de uma estirpe de TCoV presente em campo brasileiro e que, possivelmente, outras possam ter se derivado e se adaptado neste território, apresentando outra sequência neste segmento do gene S.

6 CONCLUSÕES

1 – As amostras apresentavam sinais clínicos compatíveis com o quadro descrito para aves acometidas por PEMS.

2 – O TCoV está presente nas amostras.

3 – As amostras analisadas por PCR sugerem maior predisposição das aves jovens serem infectadas por TCoV, considerando que não houve diferença estatística entre os órgãos analisados.

4 – Os resultados positivos em diferentes órgãos (traqueia, rins e pulmão), e não somente o intestino sugere um diferente tropismo da estirpe viral detectada.

5 – A reação de PCR por meio de um segmento do gene S, em sua porção S2, foi padronizada, e o vírus detectado em amostras de campo.

REFERÊNCIAS

- BUNGER, A. N. D. **Detecção e caracterização molecular do gene 3 e 5 do coronavírus de perus (TCoV) isolados de perus com severa enterite no Brasil.** 2009. 52 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BUNGER, A. N. D.; CHACÓN, J. L.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Detection and Molecular Characterization of Gene 3 and 5 of Turkey Coronavirus (TCoV) from Turkeys with Severe Enteritis in Brazil. **Avian Diseases**, v. 53, p.1-7, 2009.
- BROWN, T. P.; GARCIA, A. P., KELLEY, L. Spiking mortality of turkey poults: 1. Experimental reproduction in isolation facilities. **Avian Diseases**, v. 41, p. 604-609, 1997.
- BROWNIE, J.; SHAWCROSS, S.; THEAKER, J.; WHITCOMBE, D.; FERRIE, R.; NEWTON, C.; LITTLE, S. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 16, p. 3235 – 3241, 1997.
- CAO, J.; WU, C. C.; LIN, T. L. Complete nucleotide sequence of polyprotein gene 1 and genome organization of turkey coronavirus. **Virus Research**, v. 136, n. 1-2, p. 43-49, 2008.
- CARDOSO, T. C.; CASTANHEIRA, T. L.; TEIXEIRA, M. C.; ROSA, A. C.; HIRATA, K. Y.; ASTOLPHI, R. D.; LUVIZOTTO, M.C. Validation of an immunohistochemistry assay to detect turkey coronavirus: a rapid and simple screening tool for limited resource settings. **Poultry Science**, v. 87, n. 7, p. 1347-1352, 2008.
- CARDOSO, T. C.; FERRARI, H. F.; BREGANO, L. C.; SILVA-FRADE, C.; ROSA, A. C.; ANDRADE, A. L. Visual detection of turkey coronavirus RNA in tissues and feces by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) with hydroxynaphthol blue dye. **Molecular and Cellular Probes**, v. 24, n. 6, p. 415-417, 2010.
- CARVER, D. K.; VAILLANCOURT, J. P.; STRINGHAM, M.; GUY, J. S.; BARNES, H. J. Mortality patterns associated with poult enteritis mortality syndrome (PEMS) and coronaviral enteritis in turkey flocks raised in PEMS-affected regions. **Avian Diseases**, v. 45, p. 985-991, 2001.
- CAVANAGH, D. Structural Polypeptides of Coronavírus IBV. **Journal of General Virology**, v. 53, p. 93-103, 1981.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHARMA, M.; DRURY, S. E.; AINSWORTH, H. L.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Pathology**, v. 30, p. 355-368, 2001.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D. B.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to Coronaviruses of domestic fowl (Infectious Bronchitis Virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, p. 81-93, 2002.

CAVANAGH, D.; GELB JR.; J. Infectious Bronchitis. In: SAIF, Y. M. (Ed.); FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 12th ed. Oxford, OX: Blacwell Publishing Ltd, 2008. CD-ROM.

CHANDLER, D. P.; WAGNON, C. A.; BOLTON JR.; H. Reverse Transcriptase (RT) inhibition of PCR at low concentrations of template and its implications for quantitative RT-PCR. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 669 – 677. 1998.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. **Analytical Biochemistry**, v.162, p. 156-159, 1987.

Chromas Lite (216kb) Version 2.01. Technelysium Pty Ltd. 2005. Disponível em: <http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html>. Acesso em:18 jan. 2012.

COLLINS, A. R.; KNOBLER, R. L.; POWELL, H.; BUCHMEIER, M. J. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for cell attachment and cell-cell fusion. **Virology**, v.119, p.358-371, 1982.

DANDEKAR, A.A.; PERLMAN, S. Immunopathogenesis of coronavirus infections: implications for SARS. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 917-927, 2005.

DE GROOT, R.J.; ZIEBUHR, J.; POON, L.L.; WOO, P.C.; TALBOT, P.; ROTTIER, P.J.M.; HOLMES, K.V.; BARIC, R.; PERLMAN, S. ENJUANES, L.; GORBALENYA, A.E. **Revision of the family Coronaviridae**. In: <http://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/vertebrate-official/1230.aspx> . Acesso em 26 jun. 2012.

DEMEKE, T.; JENKINS, G. R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 6, p. 1977-1990, 2009.

DOMANSKA-BLICHAZ, K.; SEROKA, A.; LISOWSKA, A.; TOMCZYK, G.; MINTA, Z. Experimental infection with turkey coronavirus isolate. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TURKEY DISEASES. 8., 2010, Berlin. **Proceedings of the 8th international symposium on turkey diseases**. 2010. p. 117-125.

DUFFY, S.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. **Nature Review Genetics**, v. 9, p. 267-276, 2008.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Glipha – Global Livestock Production and Health Atlas. 2004. <http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp>
Acesso em 09 mar. 2009.

GenBank. National Center for Biotechnology Information. U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>>. Acesso em: 11 fev. 2010.

GOMAA, M. H.; BARTA, J. R.; OJKIC, D.; YOO, D. Complete genomic sequence of turkey coronavirus. **Virus Research**, v.135, p. 237-246, 2008.

GOMES, D. E.; HIRATA, K. Y.; SAHEKI, K.; ROSA, A. C. G.; LUVIZOTTO, M. C. R.; CARDOSO, T. C. Pathology and tissue distribution of turkey coronavirus in experimentally infected chicks and turkey poults. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 1, p.8-13, 2010. Disponível em: <doi:10.1016/j.jcpa.2009.12.012>. Acesso em: 13/jun/2012.

GOODWIN, M. A., BROWN, J., PLAYER, E. C., STEFFENS, W. L., HERMES, D.; DEKICH, M. A. Fringed membranous particles and viruses in faeces from healthy turkey poults and from poults with putative poult enteritis complex/ spiking mortality. **Avian Pathology**, v. 24, p. 497-505, 1995.

GUATELLI, J. C.; GINGERAS, T. R.; RICHMAN, D. D. Nucleic acid amplification in vitro: detection of sequences with low copy numbers and application to diagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n.2, p. 212-226, 1989.

GUY, J. S.; BARNES, H. J.; SMITH, L. G.; BRESLIN, J. Antigenic characterization of a turkey coronavirus identified in poult enteritis and mortality syndrome-affected turkeys. **Avian Diseases**, v. 41, p. 583-590, 1997.

GUY, J. S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses: a review. **Avian Pathology**, v. 29, p. 207-212, 2000.

GUY, J. S. Turkey Coronavirus Enteritis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MXDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. 11th ed. Ames, IA: Iowa State Press, 2003. P. 300-307.

GUY, J.S. Isolation and propagation of Coronavirus in embryonated eggs. In: CAVANAGH, D. **Methods in Molecular Biology: SARS and Other Coronaviruses – Laboratory Protocols**. New York, NY: Humana Press, 2008. V. 454, p. 109-117.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p.95-98, 1999.

HECKER, K. H.; ROUX, K. H. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. **BioTechniques**, v. 20, p. 478-485, 1996.

HOORFAR, J.; COOK, N. Critical aspects of standardization of PCR. In: SACHSA, K.; FREY, J. (Ed.). **Methods in Molecular Biology: PCR Detection of Microbial Pathogens**. Totowa, NJ: Humana Press Inc. 2003. V. 216, I, p. 51-64.

HUGHES, A. L. Recombinational histories of avian infectious bronchitis virus and turkey coronavirus. **Archives of Virology**, v. 156, n. 10, p. 1823-1829, 2011.

ISMAIL, M. M.; TANG, Y.; SAIF, Y. M. Pathogenicity of Turkey Coronavirus in Turkeys and Chickens. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 515 – 522, 2003.

JACKWOOD, M.W.; PATERSON, A.H.; KISSINGER, J.C.; BOYNTON, T.O.; HILT, D.A.; MCKINLEY, E.T.; MCCALL, A.W.; JACKWOOD, J.W.; BYRD, L. Recombinant origin of turkey coronavirus and divergence to different serotypes. **GenBank**, direct submission, accession n. GQ469646.1; GQ469645.1; GQ469643.1; GQ469644.1, 2009. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=recombinant%20origin%20of%20turkey>

[%20coronavirus%20and%20divergence%20to%20different%20serotypes>](#). Acesso em: 18 maio. 2012 .

JACKWOOD, M. W.; BOYTON, T. O.; HILT, D. A.; MCKINLEY, E. T.; KISSINGER, J. C.; PATERSON, A. H.; ROBERTSON, J.; LEMKE, C.; MCCALL, A. W.; WILLIAMS, S. M.; JACKWOOD, J. W.; BYRD, L. A. Emergence of a group 3 coronavirus through recombination. **Virology**, v. 398, n. 1, p. 98-108, 2010.

JENKINS, G. M.; RAMBAUT, A.; PYBUS, O. G.; HOLMES, E. C. Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, p. 156-165, 2002.

KUMAR, S.; TAMURA, I. T.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Mega 2: Molecular evolutionary analysis software. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1244-1249, 2001.

LIN, T. L.; LOA, C. C.; WU, C. C. Complete sequences of 3' end coding region for structural protein genes of turkey coronavirus. **Virus Research**, v. 106, p. 61-70, 2004.

MARUEL, S.; TOQUIN, D.; BRIAND, F. X.; QUÉGUINER, M.; ALLÉE, C.; BERTIN, J.; RAVILLION, L.; RETAUX, C.; TURBLIN, V.; MORVAN, H.; ETERRADOSSI, N. First full-length sequences of the S gene of European isolates reveal further diversity among turkey coronaviruses. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 179-189, 2011.

NAGARAJA, K. V.; POMEROY, B. S. Coronal Enteritis of Turkeys (Bluecomb Disease). In: CALNECK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. 10th ed. Ames, IA: Iowa University Press, 1997. P. 686-691.

NUCLEICS. **DNA Sequencing Troubleshooting**. 25/ Out/ 2010. Disponível em: <http://www.nucleics.com/DNA_sequencing_support/DNA-sequencing-failed-reaction.html>. Acesso em 16 jun. 2012.

O'CONNELL, J. The Basics of RT-PCR: Some Practical Considerations. In: O'CONNELL, J. **Methods in Molecular Biology: RT-PCR Protocols**. Totowa, N.J.: Humana Press Inc. 2002. V. 193, p.19-25.

OligoPerfect™ Designer. Life Technology Corporation. 2012. Disponível em: <<http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>>. Acesso em 11 fev. 2010.

POMEROY, K. A.; PATEL, B. L.; LARSEN, C. T.; POMEROY, B. S. Combined Immunofluorescence and Transmission Electron Microscopic Studies of Sequential

Intestinal Samples from Turkey Embryos and Poults Infected with Turkey Enteritis Coronavirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, p. 1348-1354, 1978.

RAPLEY, R. Polymerase Chain Reaction. In: RAPLEY, R.; WALKER, J.M. **Molecular Biomethods Handbook**. 1st Ed. Totowa, NJ: Humana Press. 1998. p. 305- 325.

RYCHLIK, W.; SPENCER, W. J.; RHOADS, R. E. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 21, p. 6409-6412, 1990.

SPAAN, W.; CAVANAGH, D.; HORZINEK, M. C. Coronaviruses: Structure and Genome Expression. **Journal of General Virology**, v.69, p. 2939-2952, 1988.

SUSLOV, O.; STEINDLER, D. A. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, 2005. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/33/20/e181.short>> Acesso em 16 jun. 2012.

TEIXEIRA, M. C. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FERRARI, H. F.; MENDES, A. R.; DA SILVA, S. E. L.; CARDOSO, T. C. Detection of turkey coronavirus in commercial turkey poults in Brazil. **Avian Pathology**, v. 36, n.1, p. 29-33, 2007.

UBA. UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual 2007-2008**. Brasília. Athalaia Gráfica-Editora. 2008.

USDA-FAS. UNITED STATE DEPARTMENT OF AGRICULTURE. FOREIGN AGRICULTURE SERVICE. **Turkey Summary Selected Countries**. 2008. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdHome.aspx> <http://www.fas.usda.gov/psdonline/psdReport.aspx?hidReportRetrievalName=Turkey+Summary+Selected+Countries&hidReportRetrievalID=50&hidReportRetrievalTemplateID=7>> Acesso em 16 mar.2009.

VENNEMA, H.; GODEKE, G. J.; ROSSEN, J. W. A.; VOORHOUT, W. F.; HORZINEK, M. C.; OPSTELTEN, D. J. E.; ROTTIER, P. J. M. Nucleocapsid independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. **The Embo Journal**, v. 15, n. 8, p. 2020-2028, 1996.

VILLARREAL, L. Y. B.; ASSAYAG, M. S.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; BUNGER, A. N. D.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; GOMES, C. R.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Identification of turkey astrovirus and turkey coronavirus in an

outbreak of poult enteritis and mortality syndrome. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.8, n.2, p. 131-135, 2006.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; YI HUANG; KWOK-YUNG YUEN. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 10, p. 1117-1127, 2009.

YU, M.; ISMAIL, M. M.; QURESHI, M. A.; DEARTH, R. N.; BARNES, H. J.; SAIF, Y. M. Viral agents associated with poult enteritis and mortality syndrome: the role of a small round virus and a turkey coronavirus. **Avian diseases**, v. 44, p. 297-304, 2000.