LAURA YANETH VILLARREAL BUITRAGO

**Coronavirus em aves: detecção, caracterização molecular e
filogenética e inoculação experimental em aves SPF**

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. Antônio José Piantino Ferreira

São Paulo

2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1310 Villarreal Buitrago, Laura Yaneth
FMVZ Coronavírus em aves: detecção, caracterização molecular e filogenética e inoculação experimental em aves SPF / Laura Yaneth Villarreal Buitrago – São Paulo : L. Y. Villarreal Buitrago , 2003.
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2003.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.
Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira.

1. Coronavírus. 2. Virologia. 3. Diarréia. 4. Aves. 5. Inoculação.
6. Transmissão. I. Título.

PARECER

Interessado: Laura Yaneth Villarreal Buitrago

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 384/2003, intitulado: "Coronacirus em aves: detecção, caracterização molecular e filogenética e inoculação experimental em aves SPF", no qual foram utilizados 100 galinhas, sob responsabilidade do Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 05 de novembro de 2003

Profª Drª Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: VILLARREAL BUITRAGO, Laura Yaneth

Título: Coronavirus em aves: detecção, caracterização molecular e filogenética e inoculação experimental em aves SPF

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: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Ao meu orientador Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira pela acolhida no Laboratório de Ornitopatologia, pelas valiosas sugestões e por acreditar e depositar a sua confiança em mim.

À Dra. Claudete pela amizade, e toda a ajuda no decorrer do meu trabalho.

Aos meus amigos e colegas do laboratório de Ornitopatologia Karina, Terezinha, Amarilis, Marcelo Pequini, Gabriela, Robson, Marcelo, Marcobacter, Márcia e Liliana.

À Sra. Maria Jose Aparecida de Louro, técnica do Laboratório de Ornitopatologia, pela sua dedicação, eficiência, apoio e amizade.

Ao Paulinho, pela ajuda no manejo nas aves e pela amizade.

À Prof. Dra. Maria Regina Baccaro pela grandíssima ajuda na interpretação dos resultados histopatológicos.

Ao Prof. Dr. Jose Antônio Jerez pelas valiosas sugestões e pela disponibilização do Laboratorio de Virologia (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratorio de virologia VPS Fabião, Pancho, Alexandre Sanches (F), Carlinhos, Sabrina (E), Gianção, pelos constantes risos e alegria contagiante e pela ajuda na realização deste trabalho.

A Silvio, Adri, Ale, Letticie, Nanci, Eugênia, Sidnei, Rodrigo, Lara, Leandro, Lira, Daniel pela amizade, pela agradável companhia e pela acolhida.

A minhas amiguinhas Aline, Vânia e Leticia.

A Manoella, pelo voto de confiança e amizade, mesmo que de longe.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pelas sugestões e disponibilização do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Solange Maria Gennari, pela disponibilização do Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho e pela amizade.

A todos os docentes, funcionários do VPS e VPT e todos os amigos que direta ou indiretamente cooperaram na realização deste trabalho.

A todos os que direta ou indiretamente contribuíram no meu crescimento laboral e pessoal.

Ao CNPq pela bolsa concedida para a realização deste mestrado.

OBRIGADA!

*Matilde, Miguel Angel y Gilmi por
ser los mejores padres del mundo
y por apoyar mis ganas de crecer,
sin importar la distancia.*

*A mis hermanos
Juancho, Mayo y Yuyo*

A mi familia en Facatativa

Abuelita Laura (in memorian)

*A Paulo Eduardo Brandão
por todos los momentos,
por compartir conmigo este trabajo
Por creer en mí siempre,
por transmitir me tantas cosas,
por todo su amor e cariño
y por estar conmigo día tras
día. Gracias, POTI.*

A DIOS GRACIAS POR MOSTRARME EL CAMINO.

RESUMO

VILLARREAL BUITRAGO, L. Y. **Coronavirus em aves:** detecção, caracterização molecular e filogenética e inoculação experimental em aves SPF. [Avian coronaviruses: detection, molecular and phylogenetic characterization and experimental inoculation in SPF birds]. 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Em uma unidade produtora de matrizes pesadas, localizada no Estado de São Paulo, foram colhidas duas amostras de conteúdo intestinal de aves com duas semanas de idade, quatro amostras de fezes da cama do mesmo lote às 18 semanas e uma amostra da cama às 30 semanas para pesquisa de coronavirus por uma técnica de nested RT-PCR dirigida a um segmento do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*). Destas, foram positivas 6 amostras correspondentes às duas aves de duas semanas, 3 às aves com 18 semanas e 1 às aves com 30 semanas. A análise filogenética da sequência do c-DNA correspondente a uma das amostras das aves de duas semanas agrupou este vírus entre os coronavirus do grupo 2. Quando inoculado pelas vias ocular e oral em aves White Leghorn SPF, evidenciou-se diarreia moderada, despigmentação e atraso no crescimento. Os exames anátomo e histopatológicos dos órgãos colhidos revelaram predominantemente enterite e atrofia de vilosidades no reto e duodeno, com infiltração de células mononucleares e exposição de lâmina própria. Aves sentinela SPF alocadas entre os grupos inoculados apresentaram os mesmos sinais clínicos e achados anátomo e histopatológicos. O coronavírus inoculado foi evidenciado em todos os grupos experimentais em intestino delgado, reto, pâncreas e pulmão, assim como em conteúdo entérico. Sequenciamento e análise filogenética foram realizados com uma amostra positiva por PCR em cada um dos grupos experimentais, confirmando a identidade entre os vírus recuperados e o vírus inoculado e a

proximidade deste vírus com os coronavírus do grupo 2, considerando-se o fragmento estudado. Estes resultados demonstram que o coronavírus encontrado, causa doença entérica nas aves, com tropismo predominante por reto e intestino delgado, transmitindo-se horizontalmente de modo eficiente poucas horas após a inoculação e que o segmento do gene *pol* estudado aproxima este vírus dos coronavírus do grupo 2.

Palavras-chave: Coronavírus. Virologia. Diarréia. Aves. Inoculação. Transmissão.

ABSTRACT

VILLARREAL BUITRAGO, L. Y. **Avian coronaviruses:** detection, molecular and phylogenetic characterization and experimental inoculation in SPF birds [Coronavirus em aves: detecção, caracterização molecular e filogenética e inoculação experimental em aves SPF]. 2003. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

In a broiler breeder farm located at São Paulo State two samples of intestinal contents of 2-week old birds, four fecal samples of the floor from the same flock at 18 weeks of age and one at 30 weeks of age were surveyed to coronavirus by a nested RT-PCR assay targeted to the RNA-dependent RNA-polymerase gene (*pol* gene). Six out of these samples were positive, two of which from the 2-week old birds, 3 from the 18-week old birds and 1 from the 30-week old birds. Phylogenetic analysis of the c-DNA sequence from one positive sample of a 2-week old bird showed that the virus clustered among group 2 coronaviruses. Oral and ocular inoculation of White Leghorn SPF birds with this coronavirus led to mild diarrhea, depigmentation and growth delay. Gross and histopathological examinations of collected tissues showed enteritis and atrophy of the villi on the small gut and rectum with mononuclear cells infiltration and exposition of the lamina propria. SPF sentinel birds placed between inoculated groups showed the same clinical signs and gross and histological findings. The inoculated coronavirus was evidenced in all experimental groups in the small gut, rectum, pancreas and lungs and also in intestinal contents. DNA sequencing and phylogenetic analysis was carried out with one positive sample per group, confirming the identity between the recovered viruses and the close relationship between this virus and group 2 coronaviruses taking into account the studied fragment. These results show that the coronavirus here found causes enteric disease in birds, with a predominant tropism by the

rectum and the small gut, being horizontally transmitted in a few hours and that the *pol* gene studied segment bring this virus close to group 2 coronaviruses.

Key words: Coronavirus. Virology. Diarrhea. Birds. Inoculation. Transmission.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Coronavírus, hospedeiros naturais e doenças por eles causadas.....	33
Quadro 2 - Primers usados para detecção do gene codificador da proteína RNA polimerase RNA- dependente.....	42
Quadro 3 - Primers usados para detecção do gene codificador da proteína HE.....	43
Quadro 4 - Distribuição das aves segundo os grupos, vias de inoculação e inóculo administrado.....	50
Quadro 5 - Relação entre os resultados da reação de PCR e os achados histopatológicos nos diferentes grupos experimentais, aves e órgãos nos dias 7, 21, 34 e 60 pos inoculação.....	85

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Representação esquemática do genoma dos coronavírus e das regiões amplificadas pela PCR *pol* (primers 2Bp + 4Bm e CV2L + CV2U) e pela PCR para o gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase (primers CHES e CHEA)..... 44
- Figura 2 -** Disposição dos grupos inoculados no CEPA (Centro de Experimental de Patologia Aviária)..... 52
- Figura 3 -** Figura 3. Alinhamento de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) entre seqüências pertencentes aos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave (SARS)..... 59
- Figura 4 -** Alinhamento de aminoácidos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) entre seqüências pertencentes aos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave (SARS)..... 60
- Figura 5 -** Arvore filogenética consenso de máxima parcimônia não enraizada utilizando as seqüências de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) dos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das

galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave(SARS).Os números acima de cada ramo indicam os valores de bootstrap referente ao mesmo..... 61

Figura 6 - Arvore filogenética consenso de máxima parcimônia não enraizada utilizando as seqüências de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) dos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave (SARS)..... 62

Figura 7 - Distribuição física dos grupos experimentais e resultados da PCR..... 68

Figura 8 - Alinhamento de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) entre seqüências pertencentes aos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV), Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave (SARS) e os diferentes virus recuperados após a inoculação (Grupo 1 ave 19, Grupo 2 ave 11, Grupo 3 ave 09 e Grupo 4 ave 07)..... 70

Figura 9 - Alinhamento de aminoácidos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) entre seqüências pertencentes aos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave (SARS) e os

diferentes vírus recuperados após a inoculação (Grupo 1 ave 19, Grupo 2 ave 11, Grupo 3 ave 09 e Grupo 4 ave 07)..... 71

Figura 10 - Arvore filogenética consenso de máxima parcimônia não enraizada utilizando as seqüências de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene pol) dos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV), Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave(SARS) e os coronavírus detectados nas aves dos grupos experimentais 1 (G1 ave 19), 2 (G2 ave 11), 3 (G3 ave 09) e 4 (G4 ave 07). Os números acima de cada ramo indicam os valores de bootstrap referente ao mesmo..... 75

Figura 11 - Arvore filogenética consenso de máxima parcimônia não enraizada utilizando as seqüências de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene pol) dos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV), Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave(SARS) e os coronavírus detectados nas aves dos grupos experimentais 1 (G1 ave 19), 2 (G2 ave 11), 3 (G3 ave 09) e 4 (G4 ave 07)..... 76

Figura 12 - Corte histológico de intestino delgado de ave inoculada pela via oral, 7 dias pós-inoculação. Notar exposição da lâmina própria na região do ápice das vilosidades e restos celulares na luz. (HE.,10X)..... 79

Figura 13 - Corte histológico de reto de ave inoculada pela por via oral, 7 dias após a inoculação. Notar edema da lâmina própria e submucosa. HE.,14X)..... 79

Figura 14 - Corte histológico de pâncreas de ave inoculada pela via oral aos 7 dias pós-inoculação. Notar degeneração vacuolar no citoplasma

	das células dos ácinos. (HE.,14X).....	80
Figura 15 -	Corte histológico de intestino delgado de ave inoculada pela via oral, 34 dias pós-inoculação. Notar enterite necrótica caracterizada por vilosidades com exposição da lâmina própria, estendendo-se à região das criptas (HE.,14X).....	80
Figura 16 -	Corte histológico de reto de ave inoculada pela via oral aos 34 dias após a inoculação. Notar proctite necrótica com fusão das projeções da mucosa e exposição da lâmina própria. (HE.,10X)....	81
Figura 17 -	Corte histológico de intestino delgado de ave inoculada pela via oral aos 60 dias pós-inoculação experimental. Notar enterite necrótica, infiltrado com predomínio de células mononucleares, proliferação de fibroblastos e deposição de fibras colágenas.(HE.,14 X)	81
Figura 18 -	Corte histológico de reto de ave inoculada pela via oral aos 60 dias após a inoculação. Notar proctite necrótica com formação de tecido de granulação. (HE.,10X).....	82
Figura 19 -	Corte histológico de pulmão de ave inoculada pela via oral aos 60 dias pós - inoculação. Notar congestão, hemorragia e parabrônquio contendo plasma. (HE., 4 X).....	82
Figura 20 -	Corte histológico de pulmão de ave inoculada pela via oral aos 60 dias pós inoculação. Notar edema do tecido interlobular caracterizado por dissociação do tecido conjuntivo. (HE., 10X).....	83
Figura 21 -	Corte histológico de pulmão de ave sentinela (grupo 2) observada aos 60 dias. Notar hiperplasia do tecido linfóide e congestão, hemorragia e edema. (HE., 4 X).....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Identidade de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene <i>pol</i>) entre seqüências pertencentes aos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave (SARS).....	58
Tabela 2 -	Resultados da aplicação da prova de PCR para a detecção do gene <i>pol</i> dos coronavírus em aves experimentalmente inoculadas com suspensão fecal de aves positivas para a presença de coronavírus entérico grupo 2 das galinhas (CECoV) quanto ao tipo de amostras testada e o momento de colheita.....	67
Tabela 3 -	Identidade de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene <i>pol</i>) entre seqüências pertencentes aos Coronavírus entérico de Galinha inoculado (CECoV), e os coronavírus dos grupos experimentais G1, G2, G3 e G4 após a inoculação.....	69
Tabela 4 -	Identidade de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene <i>pol</i>) entre seqüências pertencentes aos coronavírus canino (CCoV), Vírus da Peritonite infecciosa felina (FIPV), Coronavírus humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos suínos (TGEV), Vírus da diarreia suína epidêmica (PEDV), Coronavírus bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite murina (MHV), Vírus da encefalomielite hemaglutinante suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite infecciosa das galinhas (IBV), Coronavírus de perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória aguda grave (SARS) e os coronavirus recuperados após a inoculação (Grupo 1 ave 19, Grupo 2 ave 11, Grupo 3 ave 09 e Grupo 4 ave 07).....	73
Tabela 5 -	Resultados da técnica de PCR para o gene <i>pol</i> com os achados de necropsia de acordo com os grupos experimentais e os dias pós a inoculação.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa = aminoácido

BSA = Bovine seric albumin

µg = micrograma

µL = microlitro

DEPC = dietil-piro-carbonato

dNTP = base nitrogenada (A., G, T ou C)

et al. = e colaboradores

FEG = fibroblastos de embrião de galinha

g = aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s²)

M = molar

mg = miligrama

mL = mililitro

min = minuto

mM = milimolar

ORF = Open reading frame

PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS = solução tampão fosfato

PCR = reação em cadeia pela polimerase

q.s.p: quantidade suficiente para

RNA = ácido ribonucleico

RT = transcrição reversa

SDS = dodecilsulfato de sódio

SPF = specific pathogen free

TE = Tampão TRIS-EDTA

TRIS = hidroximetil-aminometano

Nota: Em função do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
2	OBJETIVOS.....	39
3	MATERIAL E MÉTODO.....	40
3.1	DETECÇÃO E CARATERIZAÇÃO DO CORONAVIRUS.....	40
3.1.1	Histórico.....	40
3.1.2	Amostras.....	40
3.1.3	Amostra padrão de coronavírus.....	41
3.1.4	Deteção do gene codificador da RNA-polimerase RNA dependente (Gene <i>pol</i>) dos coronavírus.....	41
3.1.5	PCR para detecção do gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase HE.....	43
3.1.6	Seqüenciamento de c-DNA.....	45
3.1.7	Análise filogenética.....	46
3.1.8	Inoculação em cultivos celulares.....	47
3.1.8.1	Preparo de fibroblastos de embrião de galinha.....	18
3.1.8.2	Inoculação em células vero e fibroblastos de embrião de galinha.....	47
3.1.9	Inoculação em ovos embrionados.....	48
3.2	DETECÇÃO DE ROTAVIRUS E REOVIRUS.....	49
3.3	INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL EM AVES SPF.....	50
3.3.1	Aves.....	50
3.3.2	Preparação do inoculo e inoculação	51
3.3.3	Observação clínica e necropsias.....	52
3.3.4	PCR e seqüenciamento para detecção do coronavírus nos animais inoculados.....	53
3.3.5	Exame histopatológico.....	53
4	RESULTADOS.....	54
4.1	DETECÇÃO DE CORONAVIRUS NAS AMOSTRAS DE CAMPO.....	54
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO VIRUS.....	54
4.2.1	PCR para detecção do gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase HE.....	54
4.2.3	Seqüenciamento de cDNA e filogenia.....	55
4.2.4	Inoculação em cultivos celulares.....	63
4.2.5	Inoculação em ovos embrionados.....	63
4.3	DETECÇÃO DE ROTAVIRUS E REOVIRUS.....	63
4.4	INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL.....	64
4.4.1	Observação clínica e necropsia.....	64
4.4.2	Deteção do coronavírus inoculado através de PCR.....	65
4.4.3	Seqüenciamento e filogenia do gene <i>pol</i> nos grupos noculados.....	69
4.4.4	Histopatologia.....	77
5	DISCUSSÃO.....	86

6	CONCLUSÕES.....	101
	REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas que afetam o trato digestivo de aves comerciais são importantes tanto em função das perdas econômicas que estas causam quanto pela afecção de outros sistemas das aves. As doenças do trato digestivo afetam o desempenho do lote, devido a diminuição do crescimento e da conversão alimentar, desuniformidade do lote, aumento à susceptibilidade de outras doenças e elevação dos custos de medicação. Os efeitos deletérios continuam muito tempo após a recuperação clínica, podendo surgir mortalidade neste período (BARNES, 1997).

Os vírus são os agentes etiológicos mais comuns na maioria das infecções que têm grande impacto na saúde da ave e no desempenho do lote, os quais incluem rotavírus, coronavírus, enterovírus, adenovírus, astrovírus e reovírus (GUY, 1998). Os vírus podem induzir alteração da mucosa intestinal, tornando-a porta de entrada para outros patógenos potenciais como *Escherichia coli*, *Campylobacter sp* e *Salmonella spp*. Como consequência de alteração na mucosa intestinal, podem desenvolver-se deficiências nutricionais, especialmente aquelas relacionadas com as vitaminas lipossolúveis e minerais. Osteoporose e outras anormalidades esqueléticas são freqüentemente encontradas em frangos de corte jovens que desenvolvem doença gastrointestinal. Além disso, estas deficiências, também podem causar disparidade no crescimento e desenvolvimento de órgãos linfóides, particularmente a bursa de Fabricius e timo. Os danos nestes órgãos linfóides podem levar a deficiências imunológicas e aumento na susceptibilidade a outras doenças infecciosas (GUY, 1998).

O conhecimento dos vírus que causam doenças entéricas em aves comerciais, assim como o conhecimento da sua imunologia, patogenia e epidemiologia, são necessários para o

desenvolvimento de medidas de profilaxia e controle adequadas. A microscopia eletrônica facilitou a identificação e posterior associação de outros vírus com doenças intestinais de aves. Entretanto, a caracterização destes vírus e a determinação da sua importância tem sido uma tarefa árdua, já que a maioria é difícil ou impossível de se cultivar usando procedimentos convencionais *in vitro* (GUY, 1998).

Dentre estes vírus, a família Coronaviridae é composta por vírus RNA que infectam uma ampla variedade de mamíferos e aves. Os coronavírus são classificados dentro da ordem Nidovirales, família Coronaviridae, que compreende os gêneros Coronavírus e Torovirus. A família Arteriviridae também pertence a esta ordem (VAN REGENMORTEL et al., 2000). O gênero coronavírus é também subdividido em três grupos, definidos de acordo com epítomos presentes nas glicoproteínas do envelope, seqüências de nucleotídeos e hospedeiros naturais (Quadro 1) (BRANDÃO et al., 2001).

O Grupo 1 inclui os vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos, Peritonite Infecciosa Felina, Coronavírus Canino, Coronavírus Humano 229-E, Coronavírus Respiratório Suíno, Vírus da Diarréia Epidêmica Suína. Classificam-se no Grupo 2 o Coronavírus Bovino, Coronavírus Humano OC-43, Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína, Vírus da Hepatite de Murinos, Vírus da Pufinose; enquanto o Grupo 3 apresenta o Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas e o Coronavírus de Perus (BRANDÃO et al., 2001; LAI e CAVANAGH, 1997; RISCO et al., 1996).

Grupo	Vírus	Infecção respiratória	Infecção entérica	Hepatite	Infecção neurológica	Outras ¹
I	HCoV-229E	X				
	Coronavírus Humano					
	TGEV Vírus da Gastroenterite	X	X			X
	Transmissível dos Suínos					
	CCoV Coronavírus Canino		X			
	FCoV Coronavírus Entérico Felino		X			
	FIPV Vírus da Peritonite Infecciosa Felina	X	X	X	X	X
	PEDV Vírus da Diarréia Suína Epidêmica		X			
	RbCV Coronavírus de Coelhos					X
	PRCoV Coronavirus Respiratório Suíno	X	X			
II	HCoV-OC43	X				
	Coronavírus Humano					
	MHV Vírus da Hepatite Murina	X	X	X	X	
	SDAV Vírus da Sialodacrioadenite	X				X
	RtCoV Coronavírus dos ratos	X				X
	HEV Vírus Hemaglutinante					
	Encefalomielite dos Suínos	X	X		X	
	BCoV Coronavírus Bovino	X	X			
III	TCoV Coronavírus dos Perus	X	X			
	IBV Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas.	X	X	X		X

1. Outras doenças causadas pelos coronavírus como: desordens imunológicas, peritonites, adenites, pancreatites e nefrites.

Quadro 1 - Coronavírus, hospedeiros naturais e doenças por eles causadas (Fonte: Holmes e Lai, 1996). São Paulo – 2003

Os coronavírus são vírus envelopados, pleomórficos, aproximadamente arredondados, com cerca de 100 – 150 nm de diâmetro, compostos por cinco ou seis proteínas estruturais (N, M, sM, HE, S, e I) dependendo da espécie viral. O RNA genômico dos coronavírus tem um tamanho entre 27 a 32 kb, sendo o maior de todos os genomas dos vírus RNA, originando um

nucleocapsídeo de simetria helicoidal em associação com a nucleoproteína N, uma fosfoproteína de 50-60 kDa rica em aminoácidos básicos (HOLMES; LAI, 1996; LAI; CAVANAGH, 1997).

Caracteristicamente, no grupo 2 apresenta-se a proteína de envelope denominada hemaglutinina-esterase (HE), que tem aproximadamente 65 kDa (KING et al., 1985). Apesar de sua denominação, a atividade hemaglutinante desta proteína é fraca quando comparada à proteína S (SCHULTZE et al., 1991). Um fato interessante é que a proteína HE dos coronavírus apresenta grande similaridade com a proteína HE dos vírus da Influenza C, deste modo, propuseram que o gene HE tenha sido adquirido pelos coronavírus do grupo 2 devido a recombinação entre um coronavírus ancestral e o vírus da influenza C (LUYTJES et al., 1988), entretanto, a característica funcional do HE dos coronavírus ainda não é conhecida (LAI; CAVANAGH, 1997).

Há duas proteínas estruturais denominadas M e E. A glicoproteína de Membrana (M), é uma das proteínas essenciais para a produção de partículas coronavírus-like. Esta glicoproteína, composta por 225 – 230 aminoácidos (aa), tem um papel importante na formação do envelope e do core do vírion. Algumas propriedades da proteína M sugerem que esta poderia estar envolvida na montagem das partículas do vírus (LAI; CAVANAGH, 1997; CLARK, 1993).

A pequena proteína de membrana (E), composta de 84 a 109 aa, é uma outra proteína de envelope necessária à montagem de partículas virais (BOS et al., 1996; VENNEMA et al., 1996)

A glicoproteína de espícula denominada S é a principal proteína estrutural do envelope dos coronavírus, sendo a principal responsável pela adsorção dos vírus às células (COLLINS et al., 1982; GODET et al., 1994; KUBO et al., 1994) e por promover a fusão do envelope viral com as membranas celulares. A proteína S forma projeções de cerca de 20 nm de comprimento, responsáveis pela aparência espiculada do vírion e pela atividade hemaglutinante. Além disso, anticorpos neutralizantes são principalmente induzidos pela proteína S (COLLINS et al., 1982).

A proteína tem um peso molecular de 180 kDa e é clivada nas subunidades S1 e S2, de 90 kDa cada uma (CAVANAGH, 1995).

A proteína S é considerada a mais polimórfica entre os coronavírus, existindo um maior polimorfismo na porção S1, a subunidade bulbar que constitui o ectodomínio da proteína. Esta diversidade em S1 provavelmente seja devido à mutação e recombinação entre os coronavírus (BRADBURN, 1972; JACOBSE-GEELS; HORZINEK, 1980; RETTING; ALTSHULER, 1985).

A subunidade S2, constituinte do caule da proteína S, é responsável pela indução da fusão de membranas, atividade necessária para a entrada viral nas células e para a observação dos efeitos citopáticos (GROOT et al., 1989; PFLEIDERER et al., 1990; TAGUCHI, 1993; YOO et al., 1991).

A análise da variabilidade encontrada na proteína S é considerada como a abordagem mais racional para se detectarem diferenças entre as amostras de uma mesma espécie de coronavírus. Por exemplo, diferenças entre sorotipos do vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas devem-se a variações na sequência de aminoácidos de duas regiões da subunidade S1 do envelope, chamadas regiões hipervariáveis. Entretanto, pouca variação foi detectada na sequência de aminoácidos da subunidade S2. Deste modo, diferenças sutis na sequência de nucleotídeos do gene codificador da glicoproteína S1 podem dar origem a novos sorotipos, que podem infectar animais previamente expostos a outros sorotipos do mesmo vírus (COMPTON et al., 1999).

A mais importante, mais conservada e mais amplamente estudada proteína não-estrutural dos coronavírus é a RNA polimerase RNA-dependente, produto de gene *pol*, o gene desta proteína não estrutural compreende dois terços da porção 5' do genoma dos coronavírus

(SNIJDER; SPAAN, 1995). Dividido em duas grandes ORF. Esta proteína é responsável pela transcrição e pela replicação viral, sendo altamente conservada entre os coronavírus, mesmo em grupos diferentes (STEPHENSEN et al., 1999).

Os coronavírus aviários (IBV e TCoV) causam várias doenças hospedeiro-específicas com grande importância econômica. A primeira doença relacionada a um coronavírus foi a Bronquite Infecciosa das Galinhas, causada pelo IBV. Em 1931, Schalk et al. (1931), observaram uma doença respiratória aguda e fatal em galinhas jovens no Estado de Dakota do Norte, EUA. Inicialmente, foi considerado como diagnóstico preliminar a pulrose, laringotraqueíte ou intoxicação por gases, no entanto quando inocularam galinhas com filtrados de exsudatos e extratos de aves doentes, estas desenvolveram os sintomas da bronquite, sendo o vírus definitivamente isolado em ovos embrionados em 1937 (BEAUDETTE; HUDSON, 1937).

O vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas é considerado, primariamente, o causador de doença do trato respiratório, embora diferentes amostras do vírus possam apresentar tropismo por outros órgãos e também afetar rins e oviduto com sérias conseqüências (CAVANAGH; NAQI, 1997). Um tropismo pelo trato entérico das aves foi descrito, podendo replicar-se no tecido intestinal e ser excretado pelas fezes, ainda que não cause enterite ou mudanças histopatológicas importantes (DHINAKAR; JONES, 1997).

O coronavírus de Perus (TCoV) foi caracterizado a partir de uma doença emergente em perus em 1951 (POMEROY; NAGARAJA, 1991). Este vírus causa uma diarreia líquida em perus entre 1 e 6 semanas de idade e desordens circulatórias que originam a tão conhecida doença da crista azul (MÖSTL, 1990). Este coronavírus apresenta uma relação filogenética próxima com o vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), sendo, deste modo, classificado dentro do grupo 3 dos coronavírus (BRESLIN et al., 1999; GUY et al., 1997). Além disso, um coronavírus

foi isolado de faisões apresentando identidade sorológica com o vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas, causando espirros (GOUGH et al., 1996), asas caídas, diminuição na postura de ovos e mortalidade rápida (SPACKMAN; CAMERON, 1983; LISTER et al., 1985; GOUGH et al., 1996; PENNYCOTT, 2000).

Até recentemente, uma revisão bibliográfica sobre os coronavírus aviários iria essencialmente basear-se na Bronquite Infecciosa Aviária. Entretanto, mesmo que o agente etiológico desta doença ainda seja o coronavírus aviário mais investigado, pesquisas nos Estados Unidos têm demonstrado que muitos casos de enterites em perus são associadas ao TCoV, genética e antigenicamente próximo ao vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV) (BRESLIN et al., 1999). Ainda, o coronavírus associado com a doença respiratória e renal em faisões, com alta similaridade ao da Bronquite Infecciosa das Galinhas, vem despertando o interesse sobre outros coronavírus em aves. O emprego de oligonucleotídeos (*primers*) genéricos, baseados na maioria das seqüências disponíveis para a avaliação de coronavírus aviários, em RT-PCR e seqüenciamento de DNA tem-se mostrado importantes na caracterização destes coronavirus (CAVANAGH et al., 2002).

A primeira exceção à exclusividade de coronavírus do grupo 3 em aves veio da identificação de um coronavírus do grupo 2 em aves marinhas costeiras no Reino Unido associado a dermatite (NUTTALL; HARRAP, 1982)

Outros coronavírus do grupo 2, como o coronavírus bovino (BCoV), causam enterite e diarreia por má absorção devido à replicação viral nas células epiteliais do intestino delgado, assim como replicação da cripta superficial e epitélio do cólon, levando a degeneração celular, descamação celular e encurtamento de vilos (CLARK, 1993; KAPIKIAN, 1994).

A afirmação do aumento no número dos vírus emergentes em nível mundial reflete-se no fato de que em quase todos os anos, pelo menos um novo patógeno é reconhecido (OSTROFF, 1999). Doenças como Hantavirose, West Nile, Síndrome Aguda Respiratória Grave (SARS), novas variedades do vírus da Influenza aviária, entre outras, predominantemente vírus RNA, são o ponto de partida para justificar uma visão diferente sobre doenças classicamente estudadas em seres humanos, em animais domésticos ou selvagens.

Assim sendo, o monitoramento da emergência de novas variantes de coronavírus aviários e sua caracterização são uma necessidade para o entendimento de sua patogenia e da epidemiologia da doença por estes desencadeadas, gerando repercussões diretas no conhecimento acerca do impacto sobre a produção avícola, sua ocorrência e distribuição entre as aves e a associação destes com outros vírus classicamente presentes em explorações avícolas comerciais.

2 OBJETIVOS

- Caracterizar um coronavírus detectado no conteúdo entérico de aves reprodutoras pesadas através de seqüenciamento e filogenia, baseados nos genes codificadores da RNA-polimerase RNA-dependente (*pol*) .
- Estabelecer os parâmetros clínicos e anatomopatológicos em aves infectadas experimentalmente, por via oral ou por via ocular, com material entérico pertencente às aves positivas por PCR para o coronavírus do grupo 2.
- Determinar a capacidade de transmissão horizontal do coronavírus entre aves inoculadas por via oral ou ocular para as aves sentinela.

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 DETECÇÃO E CARATERIZAÇÃO DO CORONAVÍRUS

3.1.1 Histórico

As aves do estudo eram procedentes de uma granja de matrizes pesadas, localizada no Estado de São Paulo. As aves desta granja apresentavam um histórico de diarreia leve, despigmentação em membros e barbelas e esporadicamente, eram observados problemas na conformação da casca dos ovos.

3.1.2 Amostras

Em novembro de 2002 o Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ – USP recebeu duas aves com duas semanas de idade, procedentes da granja de matrizes pesadas, para análise. O conteúdo intestinal foi obtido na necropsia, após o sacrifício das aves, para a pesquisa de coronavírus e rotavírus. Após 16 semanas, quatro amostras de fezes foram obtidas, aleatoriamente, da cama do galpão onde as aves estavam sendo criadas, quando o lote contava já com 18 semanas de idade e uma terceira coleta foi feita das fezes da cama quando as aves contavam com 30 semanas de idade.

O sistema de biossegurança empregado na granja era compatível com as normas de biossegurança de granjas de matrizes de frango de corte, não existindo nas imediações outras criações animais tais como bovinos ou suínos. O esquema de vacinação contra Bronquite

Infecciosa das Galinhas (IBV) incluía a vacina ocular viva H120 na primeira, segunda e terceira semana de idade e uma vacina inativada na décima-quarta semana de idade.

3.1.3 Amostra padrão de Coronavírus

Foi utilizado como controle positivo na reação de PCR e seqüenciamento, a amostra padrão Kakegawa de coronavírus bovino (AKASHI et al, 1980), que foi cultivada em células da linhagem HmLu – 1 (Pulmão de Hamster) utilizando o sistema roller, a 37°C com CO₂ a 5%.

3.1.4 Detecção do gene codificador da RNA-polimerase RNA dependente (gene *pol*) dos coronavírus

Foi utilizada uma reação de triagem para a detecção de coronavírus baseada em nested-RT-PCR para a observação de um segmento de 136 pb do gene codificador na RNA-polimerase RNA-dependente dos coronavírus (gene *pol*), localizado na ORF1b, altamente conservada entre os três grupos de coronavírus.

As amostras fecais das aves de 2, 18 e 30 semanas de idade (7 amostras) foram preparadas como suspensões a 20% em PBS 0,01 M/BSA 0,1% pH 7,2 e centrifugadas a 12000 x g/ 30 minutos a 4 °C, colhendo-se o sobrenadante. Como controle negativo, foi utilizado PBS 0,01 M pH 7,2 e como controle positivo o Coronavirus Bovino amostra Kakegawa.

A partir dos primers 4Bm e 2Bp e as condições descritas por Stephensen et al. (1999) para a amplificação de um segmento de 251 pb do gene *pol* (Figura 1), foram empregados primers internos denominados de CV2L e CV2U, com um produto esperado de 136 pb (Quadro 2).

Primers	Seqüência	Fragmento Amplificado
4BM	5' TCACAYTTWGGATARTCCCA 3'	251 pb
2BP	5' ACTCARWTRAATYTNAATAYGC 3'	251 pb
CV2U	5' TACTATGACTGGCAGAATGTTTCA 3'	136 pb
CV2L	5' AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA 3'	136 pb

Quadro 2 - Primers usados para a detecção do gene codificador da proteína RNA polimerase RNA- dependente

Síntese de c-DNA (Transcrição reversa) - foi realizada a 42°C/60' em um mix contendo 1 x First Strand Buffer (InvitrogenTM), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/μL de cada primer (2Bp e 4Bm), 7 μL de RNA extraído pelo método do TRIzol (InvitrogenTM) (de acordo com as instruções do fabricante e denaturados a 95°C/5') e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (InvitrogenTM) para uma reação final de 20μL.

PCR - A seguir, 5 μL de cDNA assim obtido foram adicionados ao PCR mix (1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada primer (2Bp e 4Bm), 1,5mM MgCl₂, 25,25 μL de água ultrapura e 1,25U Taq DNA polimerase para uma reação final de 50μL e submetidos a 6 ciclos de 94 °C/ 1', 40 °C/ 2' e 72 °C/ 1', 36 ciclos de 94 °C/ 1', 50 °C / 1,5' e 72 °C/ 1', seguidos por 72°C/10' para a extensão final.

Nested- Foi realizado com 5 μL do produto da primeira PCR assim obtido adicionados ao mix contendo 1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada primer CV2L e CV2U, 1,5mM MgCl₂, 25,25 μL de água ultrapura e 1,25U Taq DNA polymerase e submetidos a 26 ciclos de 94° C/ 1', 54,8 °C/ 1,5' e 72 °C/ 1' seguidos por 72° C/ 10' para a extensão final. Nesta etapa, foram incluídas amostras de água ultrapura a cada três amostras para avaliar-se contaminações por DNA amplificado.

3.1.5 PCR para detecção do gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase (HE)

A presença do gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase, presente somente nos coronavírus do grupo 2 (Figura 1) foi pesquisada na amostra das aves de 30 semanas através de primers genéricos para este grupo de coronavírus desenhados a partir de seqüências dos coronavírus grupo 2 a seguir: HCoV OC43 (accession number M76373.1), BCoV (accession number AF230528), HEV (accession number AF481863.1), HCoV 4408 (accession number L07747.1), vírus da Pufinose (accession number PVI5960), MHV (accession number D00764.1) e SDAV (accession number AF207551), primers senso CHES e primer anti-senso CHEA (Quadro 3) desenhados utilizando o programa *Primer Premier 5.0*. Em função da existência de gaps (inserções ou deleções), o tamanho esperado do fragmento amplificado é variável: de 796 pares de bases para os vírus HCoV OC43, BCoV, HEV e o HCoV 4408 e 826 pares de bases para os vírus SDAV, MHV e vírus da pufinose. Como controle positivo foi utilizada a amostra padrão de Coronavírus Bovino e o controle negativo PBS 0,01 M, pH 7,2.

Primers	Seqüência	Fragmento amplificado
CHES	5' TMT TTG GYG ACA GTC GTT C 3'	796 – 826 pb
CHEA	5' TTA TCM GAM TGC YTR GCA TT 3'	796 – 826 pb

Quadro 3 - Primers usados para detecção do gene codificador da proteína HE

Síntese de c-DNA (transcrição-reversa) – Foram desnaturados 7µL do RNA extraído pelo método do TRIzol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante a 95 °C durante 5

minutos adicionando-se ao mix de transcrição reversa contendo 1 x First Strand Buffer (InvitrogenTM), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/ μ L de cada primer (CHES e CHEA) e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (InvitrogenTM), para uma reação final de 20 μ L, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60'.

PCR - A seguir, 5 μ L de cada c-DNA foram adicionados ao mix de PCR (1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/ μ L de cada primer (CHES e CHEA), 1,5mM MgCl₂, 25,25 μ L água ultrapura esterilizada e 1,25U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 50 μ L e submetidos a 35 ciclos de 94 °C/ 1', 50 °C/ 1,5' e 72 °C/ 1', seguidos por 72 °C/ 10' para a extensão final. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 600 pb em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL. Como controle positivo, foi utilizada a amostra padrão de Coronavírus Bovino e como controle negativo PBS 0,01 M, pH 7,2.

Figura 1 – Representação esquemática do genoma dos coronavírus e das regiões amplificadas pela PCR *pol* (primers 2Bp + 4Bm e CV2L + CV2U) e pela PCR para o gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase (primers CHES e CHEA) (adaptado de LAI; CAVANAGH, 1997). São Paulo, 2003

3.1.6 SEQUENCIAMENTO DE c-DNA

Os fragmentos de 136 pares de base contendo a região conservada do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente (item 3.1.3), e o fragmento de 600 pb obtido do gene codificador da Hemaglutinina Esterase, obtidos para cada amostra conforme os itens 3.1.3. e 3.1.4., foram submetidos ao sequenciamento de DNA.

Primeiramente, os produtos de PCR foram purificados com o kit Concert (Invitrogen™), quantificado visualmente com o Low Mass DNA Ladder (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante e submetido ao sequenciamento de DNA em sequenciador automático ABI-310 (Applied Biosystems™).

A reação de sequenciamento consistiu em 4 µL de BigDye 3 (Applied Biosystems™), 4 µL de Tampão Save Money 5x, 4 pmol de cada primer senso e antisenso em reações separadas e 3-10 ng do DNA alvo para uma reação final de 20µL, levando-se ao termociclador PTC-200 (MJ Research™) para 35 ciclos de 96 °C/ 30 segundos, 50 °C/ 15 segundos e 60 °C/ 4 minutos, com rampa de 0,7 °C / segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12.000 x g/ 25', removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g/5' e secando-se o precipitado.

3.1.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso de cada amostra foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002 Technelysium Pty LTD) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas seqüenciadas. A seqüência consenso final de cada amostra foi obtida a partir das seqüências senso e o reverso-complemento das seqüências anti-senso de cada amostra alinhadas com o programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall), sendo a mesma submetida ao BLASTn para a confirmação do seqüenciamento.

A árvore filogenética para o gene *pol* foi construída com as seqüências consensuais de cada amostra alinhadas com o programa Bioedit, usando as seqüências dos coronavírus a seguir: Coronavírus Bovino (AF124985), Coronavírus Humano OC-43 (AF124989), Vírus da Hepatite dos Ratos (X51939), Vírus da Sialodacrioadenite dos Ratos (AF124990), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante (AF124988), Coronavírus Humano 229-E (X69721), Vírus da Diarréia Epidêmica Suína (AF353511), Vírus da Peritonite Infeciosa Felina (AF124987), Coronavírus Canino (AF124986), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (AF124992), Coronavírus de Peru (AF124991) e Vírus da Bronquite Infeciosa das Galinhas (M95169), conferindo-se manualmente o alinhamento, obtendo-se a árvore de máxima parcimônia consenso com o algoritmo exato “branch-and-bound” e os valores de “bootstrap” com o programa PAUP 4.0 b10 (© 2000 Smithsonian Institution). As identidades entre as seqüências alinhadas foram calculadas com o programa Bioedit. Para o alinhamento de seqüências de aminoácidos foi utilizada a matriz de substituição BLOSUM 62 dentro do programa Bioedit.

3.1.8 INOCULAÇÃO EM CULTIVOS CELULARES

Foram utilizadas células de linhagem VERO e células de cultivo primário de Fibroblastos de embrião de Galinha (FEG) na tentativa de isolamento do coronavírus (CECoV).

3.1.8.1 PREPARO DE FIBROBLASTOS DE EMBRIÃO DE GALINHA

O cultivo primário foi feito seguindo o procedimento descrito por Rizzo, Tuchiya e Martinez (1983):

1. Ovos SPF de 10 dias de idade foram utilizados para a elaboração dos fibroblastos de embrião de galinha. A casca dos ovos foi desinfetada com gaze embebida em álcool iodado a 5%, sendo quebrados pelo seu pólo maior com tesouras estéreis e retirados os pedaços de casca e da membrana. Posteriormente, os embriões foram retirados com uma pinça estéril e colocados numa placa de Petri estéril.
2. Procedeu-se à lavagem dos embriões com PBS 0,01 M pH 7,4, adicionado de antibiótico (gentamicina 0,01mg/ml), para retirar-se as hemácias e outros restos celulares.
3. O tecido picotado foi colocado em um Erlenmeyer com pérolas de vidro estéreis e foram adicionados 3 mL de tripsina para cada embrião.
4. Foram realizadas duas tripsinizações de 10 minutos cada, coletando-se o líquido sobrenadante e adicionando meio de cultivo MEM EARLE com 5% de soro fetal bovino para se inibir o efeito da tripsina.
5. Com as células já prontas, realizou-se a contagem destas com azul de tripan , diluindo-se as células em meio MEM EARLE adicionado com soro fetal bovino a 10%, para $5,0 \times 10^5$ células/mL.

3.1.8.2 Inoculação em células VERO e fibroblastos de embrião de galinha (FEG)

Um pool das quatro amostras fecais referentes às aves de 18 semanas de idade foi preparado como uma suspensão a 20% em PBS 0,01 M pH 7,2 e centrifugadas a 12.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi adicionado de gentamicina para uma concentração final de 0,1 mg/ mL e filtrado em membranas de 0,22 µm.

A seguir, o material assim preparado foi inoculado em volume de 1mL para cada garrafa de cultivo celular de 25 cm² contendo monocamadas confluentes de 48 horas de crescimento de células VERO e de FEG, procedendo-se a adsorção durante 1 hora a 37° C, após o que se adicionaram 6 mL de meio mínimo de Eagle com 5% de soro fetal bovino, mantendo-se a 37°C e observando-se o aparecimento de alterações na monocamada por até 10 dias. Após esse período, a garrafa foi congelada a – 80°C e uma nova passagem foi feita a partir dessa garrafa, inoculando-se 1 mL da passagem anterior. As inoculações eram monitoradas a cada passagem pela técnica de PCR, procurando amplificar o gene *pol* do coronavírus (item 3.1.3)

3.1.9 Inoculação em ovos embrionados

Foram utilizados ovos embrionados de galinhas SPF com 8 dias de incubação fornecidos pelo laboratório BIOVET (Vargem Grande Paulista – SP) para a tentativa de isolamento do coronavírus. Pelas cavidades alantóide e membrana corioalantóide foram inoculados 0,2 mL da suspensão de fezes de um pool referente às aves de 18 semanas de idade (item 3.1.8.2).

Os ovos foram observados sob ovoscopia diariamente duas vezes ao dia, durante um período de 7 dias, sendo eliminados os ovos que apresentassem morte embrionária nas primeiras 24 horas. Após o período de 7 dias, foram colhidos os líquidos alantóides dos ovos com embriões vivos, no caso de inoculação na cavidade alantóide, e as membranas corioalantóides no caso da inoculação por esta via. Os líquidos alantóides eram submetidos a uma nova passagem pela mesma via, inoculando-se 0,2 µL da passagem anterior, num total de 4 passagens. As membranas corioalantóides, após serem maceradas, filtradas em 0,22 µm e tratadas com gentamicina 1 mg/mL, eram inoculadas com 0,2 µL da passagem anterior, pela mesma via, num total de 3 passagens.

A cada passagem, os ovos inoculados eram testados para a presença do Coronavírus pela técnica da RT-PCR buscando amplificar o gene pol da RNA-Polimerase RNA- dependente (item 3.1.3).

Antes de realizar qualquer inoculação nos ovos embrionados, foram escolhidos ao acaso, vários deles, os embriões foram macerados e testados pela RT-PCR para confirmar que os mesmos estivessem livres de coronavírus.

3.2. DETECÇÃO DE ROTAVÍRUS E REOVIRUS

A presença de rotavírus e reovirus foi pesquisada usando a prova de eletroforese em gel de poliacrilamida (HERRING et al., 1982) nas amostras de fezes das aves de 2 e de 18 semanas de idade.

3.3 INOCULAÇÃO EXPERIMENTAL EM AVES SPF

3.3.1 Aves

Foram utilizadas 100 aves SPF (Specific Pathogen Free) da linhagem White Leghorn, sendo 72 aves de 5 dias de idade e 28 aves de 21 dias de idade, fornecidas pelo laboratório Biovet, e divididas em diferentes grupos. (Quadro 4)

Grupo	Número de aves	Idade	Via de inoculação	Inoculo	Volume
1	17	5 dias	Oral	Suspensão fecal	0,5 mL
2*	8	5 dias	Oral	PBS	0,5 mL
3	17	21 dias	Ocular	Suspensão fecal	0,2 mL
4*	8	21 dias	Ocular	PBS	0,2 mL
5*	25	5 dias	Não inoculadas	---	---
6*	25	5 dias	Não inoculadas	---	---

* Os grupos 2, 4, 5 e 6 foram utilizados como sentinela para avaliar-se a transmissão horizontal do vírus inoculado, sendo que os grupos 2 e 4 foram inoculados com PBS.

Quadro 4 - Distribuição das aves segundo os grupos, vias de inoculação e inóculo administrado

As aves foram inoculadas no dia posterior à instalação nas gaiolas, e foram realizadas necropsias em diferentes períodos após a inoculação (7, 21, 34 e 60 dias), sendo os grupos mantidos em boxes separados de 1,70 m², (Figura 2), recebendo ração comercialmente disponível e água *ad libitum*.

3.3.2 Preparação do inóculo e inoculação

Foram utilizadas as amostras obtidas das aves de 18 semanas de idade, que haviam sido classificadas como positivas o para coronavírus pela técnica de RT-PCR. O inóculo foi feito segundo o seguinte protocolo:

- 1) Preparar uma suspensão de fezes a 20%, com PBS 0,01 M, pH 7,4.
- 2) Centrifugar por 12000 x g / 30 minutos / 4 °C.
- 3) Adicionar ao sobrenadante gentamicina 0,1 mg/ mL e filtrar através de membranas de 0,22 micrometros.
- 4) Ultracentrifugar o sobrenadante filtrado a 100.000 x g / 3 h a 4 °C (Beckman).
- 5) Ressuspender o pellet em 10 mL de PBS 0,01 M, pH 7,4 estéril.
- 6) Manter a suspensão a -80 °C até o momento da inoculação nas aves.

O inóculo assim obtido foi administrado às aves de acordo com o quadro 4, sendo os grupos dispostos conforme a figura 2.

Antes da inoculação, amostras fecais de cada grupo foram coletadas em “pool” para a pesquisa de coronavirus por PCR (item 3.1.3), ainda, por este mesmo método, 6 embriões de 7 dias de idade, macerados sob a forma de pool, foram pesquisados para Coronavirus, com o intuito de se verificar a existência do vírus na origem das aves.

Figura 2 - Disposição dos grupos de aves mantidas no CEPA (Centro Experimental de Patologia Aviária)

3.3.3 Observação clínica e necrópsia

A partir do momento da inoculação até o último dia experimental (dia 60), as aves inoculadas e sentinelas foram observadas quanto ao surgimento de sinais indicativos de doença entérica, como emplastramento de fezes na região cloacal e presença de fezes com consistência alterada sobre a cama. As aves foram também acompanhadas quanto ao surgimento de sinais respiratórios, como espirros e secreções nasais. Além disso, procurou-se a despigmentação em bico e pernas.

Nos dias 1 e 3 após a inoculação, amostras de fezes dos grupos 1, 2, 3 e 4 foram analisadas por PCR para determinar-se a presença do coronavírus grupo 2.

As aves foram sacrificadas através da inalação de clorofórmio e necropsiadas no dia 7 (3 aves/grupo 1 e 3, 1 ave/grupo 2 e 4); dia 21 (6 aves/grupo 1 e 3, 2 aves/grupo 2 e 4); no dia 34 (6 aves/grupos 1 e 3, 2 aves/grupos 2 e 4) e no dia 60 (2 aves/grupos 1 e 3, 3 aves/grupos 2 e 4). Todas as aves dos grupos 5 e 6 (grupos sentinela) foram mantidas até 60 dias após o início do experimento, quando foram sacrificadas, necropsiadas e tiveram amostras colhidas em pools de 5 aves para o processamento por PCR.

À necrópsia, foram pesquisadas lesões macroscópicas na musculatura peitoral e da coxa, trato gastrointestinal, fígado, sistema respiratório, baço e bursa de Fabricius. Foram colhidos fragmentos de tecido de reto, duodeno, pâncreas e pulmão, bem como o conteúdo intestinal das aves necropsiadas. As amostras foram armazenadas a -80 °C até a realização do PCR para a detecção do coronavírus pelo gene *pol*.

3.3.4 PCR e seqüenciamento para a detecção do coronavírus nos animais experimentais

A presença do vírus inoculado nos diversos órgãos foi pesquisada utilizando-se a reação de PCR para a amplificação do gene *pol* (item 3.1.3). Uma amostra positiva de cada lote foi submetida ao seqüenciamento de DNA para confirmar a identidade entre o vírus inoculado e o vírus recuperado nas aves desafiadas experimentalmente (item 3.1.6 e 3.1.7).

3.3.5 Exame histopatológico

Foram enviados para exame histopatológico, fragmentos de tecido de reto, duodeno, pâncreas e pulmão de aves positivas na PCR em pelo menos um destes órgãos. Estes tecidos foram fixados em formol 10%, desidratados em álcool, diafanizados em xilol, incluídos em parafina e corados pelo método da Hematoxilina e Eosina (HE) (McMANUS; MOWRY, 1965).

4. RESULTADOS

4.1 DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS NAS AMOSTRAS DE CAMPO

A reação de RT-PCR para o gene *pol* evidenciou a presença de coronavírus em seis de sete amostras testadas, sendo duas (2) amostras pertencentes ao conteúdo intestinal obtido das aves de duas semanas de idade, três (3) amostras do total de quatro (4) amostras de fezes da cama do mesmo lote com 18 semanas de idade e uma (1) amostra obtida do mesmo lote com 30 semanas de idade. Estas amostras apresentavam a banda de 136 pb, compatível com aquela do controle positivo (amostra Kakegawa de coronavírus bovino). As reações referentes a controle negativo (PBS) e os controles incluídos na fase de nested (água ultra pura) não apresentaram quaisquer bandas.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO VÍRUS

4.2.1 PCR para a detecção do gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase (HE)

A aplicação de uma reação de RT-PCR para a amplificação de um segmento correspondente ao gene codificador da hemaglutinina esterase, exclusivo dos coronavírus do grupo 2, utilizando primers degenerados, resultou em uma banda de aproximadamente 600 pb para as amostras de fezes das matrizes com 30 semanas de idade. O controle positivo

(coronavírus bovino amostra Kakegawa) apresentou uma banda de 796 pb, enquanto o controle negativo não apresentou bandas na eletroforese.

4.2.3 Seqüenciamento de cDNA e filogenia

O fragmento de 136 pb do gene *pol* referente a uma das amostras positivas para o coronavírus das aves de duas semanas de idade, provisoriamente chamado de CECoV (Chicken Enteric Coronavirus), foi submetido ao seqüenciamento de DNA e a seqüência de 113 nucleotídeos obtida foi utilizada para construir a árvore filogenética a partir de seqüências do gene *pol* dos coronavírus já enunciados. As seqüências foram alinhadas com o programa Clustal/W (Figura 3), traduzidas em seqüências de aminoácidos alinhadas (Figura 4) e a árvore consenso de máxima parcimônia com os valores do “bootstrap” para as seqüências de nucleotídeos foi obtida com o programa PAUP versão 4.0b 10 (© 2001. Smithsonian Institution) utilizando o algoritmo exato Max-mini “branch-and-bound” (Figuras 6 e 7). A seqüência obtida foi depositada no *Genbank* sob número de acesso **AY273903**.

Quando comparadas as identidades de nucleotídeos para a região de alinhamento, observou-se baixa identidade entre o CECoV e os coronavírus pertencentes ao grupo 3: 58,0% com TCoV e 57,1% com o IBV, com média de 57,55% para este grupo; comparando-se com o grupo 1, foram encontradas identidades de 69,9% com HCoV 229E, 56,2% com PEDV, 58,0% com TGEV, 58,9% com CCoV e 58,0% com FIPV, com média de 60,2% para este grupo. Entretanto, quando comparada a seqüência do CECoV com os coronavírus pertencentes ao grupo 2, obtiveram-se identidades de 84,8% com HCoV OC43, 84,8% com HEV, 87,5% com BCoV, 78,5% com MHV e 80,3% com o SDAV, com média de 83,18% para este grupo (Tabela 1).

Quando comparadas em termos de aminoácidos as seqüências correspondentes ao CECoV e os coronavírus citados na figura 3, observam-se 6 mutações não sinônimas exclusivas do CECoV em áreas de identidade completa entre os outros coronavírus (T→Y; M→G; T→N; Y→L; G→A; K→R). Além disso, há outras três mutações não sinônimas em sítios variáveis no alinhamento de aminoácidos, sendo os aminoácidos resultantes também exclusivos ao CECoV (A-V→F; S-T→P; S-T→L). Fora dessas áreas de discrepância, o alinhamento mostrou identidade total de 27 aminoácidos quando comparado aos coronavírus do grupo 2. No alinhamento de aminoácidos da figura 4, verificaram-se três posições de aminoácidos (G na posição 4, M na posição 6 e D na posição 36), que são grupo-específicas para os coronavírus do grupo 2 e são também encontradas na seqüência referente ao CECoV.

Em relação ao grupo 2, o CECoV apresentou na posição 62 do alinhamento de nucleotídeos, uma mutação silenciosa, sendo A (exclusiva do CECoV e do SARS) no lugar de T ou C. Houve também uma mutação não silenciosa na posição 21 de aminoácidos, devido a uma troca do nucleotídeo G para T na posição 63 do alinhamento dos nucleotídeos. Na posição 25 do alinhamento de aminoácidos, o CECoV apresentou uma mutação não silenciosa exclusiva de T para L, pela troca de A para T na posição 75 do alinhamento nucleotídico. No códon seguinte, o alinhamento de nucleotídeos apresentou um gap que levou a mudança no passo de leitura e, assim, a mutação não silenciosa. Na posição 27 do alinhamento de aminoácidos, houve uma mutação de T para P, devido à mudança no passo de leitura. No códon da Leucina, localizada no aminoácido 28, houve uma mutação não silenciosa e uma silenciosa na posição 3 desse códon de A para T. Na posição 29 de aminoácidos, houve mudança de K para R, observada também pela mudança do passo de leitura gerado pelo gap, além da inserção de um A na terceira posição.

A árvore filogenética não enraizada, construída pelo método de máxima parcimônia agrupou os coronavírus em clusters concordantes com a classificação dos coronavírus (VAN

REGENMORTEL et al., 2000): vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas e Coronavírus de Perus, classificados no grupo 3, foram agrupados em um cluster único; os Coronavírus Bovino, Coronavírus Humano OC43, Vírus da Hepatite Murina, Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína e Vírus da Sialodacrioadenite pertencentes ao grupo 2, foram classificados em um único cluster independente; o grupo 1, que inclui Coronavírus Canino, Vírus da Peritonite Infecciosa Felina, Coronavírus Humano 229E, Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos e Vírus da Diarréia Suína Epidêmica foram também agrupados em um cluster único e finalmente o coronavírus causador da Síndrome Aguda Respiratória Severa, SARS, classificada em um cluster separado (Figuras 5 e 6). De acordo com as mesmas figuras, o CECoV foi agrupado dentro do grupo 2 dos coronavírus, com valor de bootstrap 69, próximo ao Coronavírus Bovino.

Tabela 1- Identidade de nucleotídeos (em porcentagem) de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene pol) entre seqüências pertencentes aos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus Entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS)

Grupo 1						Grupo 2					Grupo 3		SARS
Vírus	HCoV 229E	PEDV	TGEV	CCoV	FIPV	HCoV OC43	HEV	BCoV	MHV	SDAV	TCoV	IBV	SARS
CECoV	69,9	56,2	58,0	58,9	58,0	84,8	84,8	87,5	78,5	80,3	58,0	57,1	62,5

	10	20	30	40	50	60
CCoV	CTACCATGACTACGACCAATACCA	CCAGAACATTTGAAGTCAATTGCTGCAACACGCA				
FIPV	T.....					
HCoV229E	T.....					
TGEV	T.....					
PEDV	T.....					
BCoV	T.....					
HCoVOC43	T.....					
CECoV DEFINITIVO	T.....					
MHV	T.....					
HEV	T.....					
SDAV	T.....					
IBV	T.....					
TCoV	T.....					
SARS	T.....					

	70	80	90	100	110
CCoV	ATGCCACTGTGGTTATTGGCTCAACCAAG-TTTTATGGTGGTTGGGATAACA				
FIPV	T.....				
HCoV229E	C.....				
TGEV	T.....				
PEDV	T.....				
BCoV	T.....				
HCoVOC43	T.....				
CECoV DEFINITIVO	T.....				
MHV	T.....				
HEV	T.....				
SDAV	T.....				
IBV	T.....				
TCoV	T.....				
SARS	T.....				

Figura 3 - Alinhamento de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene pol) entre seqüências pertencentes aos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus Entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS)

Figura 4 -Alinhamento de aminoácidos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) entre seqüências pertencentes aos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS)

Figura 5- Árvore filogenética consenso de máxima parcimônia não enraizada utilizando as seqüências de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) dos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus Entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave(SARS). Os números acima de cada ramo indicam os valores de bootstrap referente ao mesmo

Figura 6 - Árvore filogenética consenso de máxima parcimônia não enraizada utilizando as seqüências de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) dos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus Entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS)

4.2.4 Inoculação em cultivos celulares

Foram feitas 4 passagens sucessivas em cultivo primário de embrião de galinha (FEG) e em células VERO. Quando acompanhadas por um período de até 10 dias, em nenhuma das passagens se evidenciou qualquer efeito citopático. Ainda, quando examinadas no PCR para a detecção do gene *pol* dos coronavírus, nenhuma das passagens apresentou resultado positivo nas duas linhagens celulares.

4.2.5 Inoculação em ovos embrionados

Realizaram-se 3 e 4 passagens sucessivas em ovos embrionados de 8 dias de idade, pelas vias membrana corioalantóide ou cavidade alantóide, respectivamente. Quando colhidos após 7 dias de incubação em cada passagem, não foram observadas alterações de desenvolvimento dos embriões nas diferentes vias de inoculação. Tanto o líquido alantóide como as membranas, de cada passagem, foram examinadas por PCR para a detecção do gene *pol* dos coronavírus e apresentaram-se negativas.

4.3 Detecção de rotavírus e reovírus

As amostras de campo correspondentes ao conteúdo intestinal das aves de duas semanas e as fezes da cama das aves de 18 e 30 semanas de idade analisadas pela técnica de PAGE mostraram-se negativas tanto para rotavírus como para reovírus.

4.4 Inoculação experimental

4.4.1 Observação clínica e necrópsia

A partir do terceiro dia após a inoculação experimental, evidenciou-se diarreia leve com fezes de aspecto pastoso e coloração marrom nos grupos 1 e 3 (inoculados via oral ou ocular, respectivamente). A diarreia persistiu durante todo o período experimental, apresentando as mesmas características quanto a consistência e quantidade de fezes moderada. Esta diarreia começou a ser observada nos grupos sentinela 2 e 4 também a partir do terceiro dia após a inoculação.

Durante a primeira quinzena do experimento, as aves dos grupos 1, 2, 3 e 4 apresentaram também períodos de sonolência, penas eriçadas e despigmentação de pernas e bico, sendo estes sinais mais acentuado no grupo 3 (inoculado via ocular). Ainda, nos grupos 1 e 3 foi observado retardo do crescimento em algumas aves.

Nas 50 aves sentinela dos grupos 5 e 6 não foram encontrados sinais clínicos de doença em nenhum momento durante todo o experimento.

Os achados macroscópicos mais comuns, encontrados a partir de 7 dias pós-inoculação (primeira necrópsia) até o dia 60 (última necrópsia) foram o aumento e congestão do pâncreas, congestão do intestino delgado, conteúdo intestinal líquido, dilatação e congestão do reto. Estes achados foram mais comuns aos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4, ainda que não tenham sido constantes em todas as aves necropsiadas. Afora estes achados, nos grupos 1 e 3 era evidente a despigmentação da musculatura peitoral.

Nas aves sentinela dos grupos 5 e 6, não foram achadas alterações anátomo-patológicas durante a necrópsia, feita unicamente no último dia do experimento (dia 60 pós-inoculação).

4.4.2 Detecção do coronavírus inoculado através de PCR

Todas as amostras de fezes dos diferentes grupos experimentais, apresentaram-se negativas antes do desafio com o CECoV. Três dias pós-inoculação, a mesma técnica evidenciou a presença do coronavírus inoculado nas fezes das aves sentinelas (grupos 2 e 4) e aves inoculadas por via ocular (grupo 3).

Aos 7 dias após a inoculação experimental, evidenciou-se a presença do vírus em três amostras de reto e uma amostra de pulmão correspondente às três aves necropsiadas do grupo 1. Quanto ao grupo 2, no mesmo período, foi detectado o vírus no reto da ave necropsiada. O grupo 3 apresentou-se positivo, exclusivamente no conteúdo intestinal de uma das três aves necropsiadas e, no grupo 4 no tecido retal.

Aos 21 dias pós-inoculação, observou-se o seguinte padrão: no grupo 1, a presença do vírus foi detectada somente em uma amostra de tecido pulmonar de uma ave e em três conteúdos intestinais correspondentes a três aves das seis necropsiadas; no grupo 2, o vírus foi observado em uma amostra de intestino correspondente a uma ave das duas necropsiadas. No grupo 3, nas seis aves necropsiadas, foi detectado o vírus nos diferentes órgãos testados: uma ave foi positiva ao coronavírus no pâncreas, uma ave no tecido retal, uma no tecido intestinal, uma no tecido pulmonar e três aves apresentaram positividade no conteúdo intestinal. O grupo 4 apresentou-se positivo no conteúdo intestinal correspondente a uma ave das duas necropsiadas.

Aos 34 dias após a inoculação, no grupo 1 foram necropsiadas seis aves, sendo que uma apresentou-se positiva no pâncreas, uma no reto e outra no tecido pulmonar. No grupo 2, as duas aves necropsiadas foram positivas no tecido retal e no intestino delgado, e uma delas também apresentou-se positiva no pulmão. O grupo 3 apresentou três aves positivas no tecido pulmonar e duas aves no conteúdo intestinal positivo, de um total de seis aves sacrificadas. As duas aves

necropsiadas do grupo 4 evidenciaram o vírus em todos os órgãos analisados (reto, pâncreas, intestino delgado e pulmão), no entanto as amostras de conteúdo intestinal foram negativas.

Aos 60 dias pós-inoculação, obteve-se o seguinte resultado: no grupo 1, de duas aves, uma apresentou tecido retal positivo para o coronavírus e duas aves foram positivas no conteúdo intestinal. No grupo 2, de três aves testadas, uma apresentou o tecido pulmonar positivo e todas apresentaram o conteúdo intestinal positivo. No grupo 3, detectou-se o vírus somente no conteúdo intestinal das duas aves necropsiadas. O grupo 4 apresentou-se negativo em todos os órgãos testados, bem como no conteúdo intestinal. Todas as amostras colhidas dos grupos sentinela 5 e 6 foram negativas para a presença do coronavírus, exceto uma amostra de pool de conteúdo intestinal do grupo 6. Estes resultados encontram-se na tabela 2 e na figura 7.

Tabela 2- Resultados do PCR para a detecção do gene *pol* dos coronavírus em aves experimentalmente inoculadas com suspensão fecal de aves positivas para a presença de coronavírus entérico grupo 2 das galinhas (CECoV)

GRUPO	TECIDO	Dias pós-inoculação				
		3	7	21	34	60
GRUPO 1	Pâncreas	NT	0/3	0/6	1/6	0/2
	Reto	NT	3/3	0/6	1/6	1/2
	Intestino Delgado	NT	0/3	0/6	0/6	0/2
	Pulmão	NT	1/3	1/6	1/6	0/2
	Conteúdo intestinal	Negativo *	0/3	3/6	0/6	2/2
GRUPO 2	Pâncreas	NT	0/1	0/2	0/2	0/3
	Reto	NT	1/1	0/2	2/2	0/3
	Intestino Delgado	NT	0/1	1/2	2/2	0/3
	Pulmão	NT	0/1	0/2	1/2	1/3
	Conteúdo intestinal	Positivo *	0/1	0/2	0/2	3/3
GRUPO 3	Pâncreas	NT	0/3	1/6	0/6	0/2
	Reto	NT	0/3	1/6	0/6	0/2
	Intestino Delgado	NT	0/3	1/6	0/6	0/2
	Pulmão	NT	0/3	1/6	3/6	0/2
	Conteúdo intestinal	Positivo *	1/3	3/6	2/6	2/2
GRUPO 4	Pâncreas	NT	0/1	0/2	2/2	0/3
	Reto	NT	1/1	0/2	2/2	0/3
	Intestino Delgado	NT	0/1	0/2	2/2	0/3
	Pulmão	NT	0/1	0/2	2/2	0/3
	Conteúdo intestinal	Negativo *	0/1	1/2	0/2	0/3

NT: Não testado

* Pool de fezes de aves vivas.

Número de aves positivas pela PCR / Número de aves necropsiadas

7 DPI				21 DPI																																																																																																							
Inoculado via oral CECoV GRUPO 1	Controle via oral GRUPO 2	Inoculado via ocular CECoV GRUPO 3	Controle via ocular GRUPO 4	Inoculado via oral CECoV GRUPO 1	Controle via oral GRUPO 2	Inoculado via ocular CECoV GRUPO 3	Controle via ocular GRUPO 4																																																																																																				
Ave 02 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	+	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 1 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	+	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 26 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 07 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	+	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 20 Ave 90 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	+	Cl	-	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 178 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>+</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	+	Pu	-	Cl	-	Ave 49 Ave 63 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>+</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>+</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	+	Pu	-	Cl	+	P	+	R	-	In	-	Pu	+	Cl	-	Ave 0 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	+																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	+																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	+																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
Ave 03 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	+	In	-	Pu	-	Cl	-		Ave 70 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-		Ave 94 Ave 179 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 226 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 64 Ave 77 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 205 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-																				
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
Ave 04 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	+	In	-	Pu	+	Cl	-		Ave 168 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+		Ave 197 Ave 555 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+	Ave 107 Ave 125 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+																																										
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
34 DPI				60 DPI																																																																																																							
Inoculado via oral CECoV GRUPO 1	Controle via oral GRUPO 2	Inoculado via ocular CECoV GRUPO 3	Controle via ocular GRUPO 4	Inoculado via oral CECoV GRUPO 1	Controle via oral GRUPO 2	Inoculado via ocular CECoV GRUPO 3	Controle via ocular GRUPO 4																																																																																																				
Ave 07 Ave 22 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>+</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	P	+	R	-	In	-	Pu	+	Cl	-	Ave 11 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>+</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	+	In	+	Pu	-	Cl	-	Ave 01 Ave 28 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 13 <table><tr><td>P</td><td>+</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>+</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	+	R	+	In	+	Pu	+	Cl	-	Ave 19 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	+	In	-	Pu	-	Cl	+	Ave 15 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	+	Cl	+	Ave 09 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+	Ave 108 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	+																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	+																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	+																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	+																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
Ave 33 Ave 42 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 12 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>+</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	+	In	+	Pu	+	Cl	-	Ave 62 Ave 72 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	+	Cl	+	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	Ave 120 <table><tr><td>P</td><td>+</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>+</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	+	R	+	In	+	Pu	+	Cl	-	Ave 20 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+	Ave 16 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+	Ave 233 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+	Ave 123 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	+																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	+																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	+																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
Ave 101 Ave 333 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>+</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-	P	-	R	+	In	-	Pu	-	Cl	-		Ave 84 Ave 118 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table> <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>+</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	+	Cl	+	P	-	R	-	In	-	Pu	+	Cl	-		Ave 17 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>+</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	+		Ave 163 <table><tr><td>P</td><td>-</td></tr><tr><td>R</td><td>-</td></tr><tr><td>In</td><td>-</td></tr><tr><td>Pu</td><td>-</td></tr><tr><td>Cl</td><td>-</td></tr></table>	P	-	R	-	In	-	Pu	-	Cl	-																																									
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	+																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	+																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	+																																																																																																										
P	-																																																																																																										
R	-																																																																																																										
In	-																																																																																																										
Pu	-																																																																																																										
Cl	-																																																																																																										

Figura 7 - Distribuição física dos grupos experimentais e resultados da PCR

4.4.3 Sequenciamento e análise filogenética do gene *pol* nos grupos experimentais

Foi submetida à reação de sequenciamento para o gene *pol*, conforme item 3.1.5, uma amostra positiva de cada grupo inoculado e dos sentinela 2 e 4.

A identidade de nucleotídeos entre as quatro amostras experimentais para a região de alinhamento mostrada na figura 8 foi de 100%. Quando comparadas com a sequência correspondente ao vírus original presente no inóculo, a identidade foi 88,3% (tabela 3). Observando-se as seqüências de aminoácidos alinhadas correspondentes a esta seqüência de nucleotídeos (Figura 9), notam-se 9 mutações não sinônimas em relação ao vírus inoculado (Y→T; G→M; N→T; F→V; L→I; A→G; P→T; L→T e R→K).

Tabela 3 - Identidade de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) entre as seqüências pertencentes aos Coronavírus entérico de Galinha inoculado (CECoV), e os coronavírus dos grupos experimentais G1, G2, G3 e G4 após a inoculação

Vírus	Vírus inoculados			
	G1	G2	G3	G4
CECoV	88.3%	88.3%	88.3%	88.3%

Observando-se as seqüências traduzidas para aminoácidos, a identidade dos coronavírus recuperados com os coronavírus do grupo 2 foi de 100% (Figura 6). Além disso, na região do alinhamento de nucleotídeos correspondente às seqüências de aminoácidos, posições 3 a 111 da figura 10 não foi evidenciada nenhuma mutação silenciosa.

	10	20	30	40	50	60
CCoV	CTACCATGACTACGAGACAATACCA	CCAAGCAATTTGAAGTCAATTGCTGCAACACGCA				
FIPV	T.....	G.TT.T.....	ATG.C.....	A.C.A.TA.T.....	CA.A.	
HCoV229E	T.....	T.....				
TGEV	T.....	T.....				
PEDV	.A.....C.TC.G..G..T.T.....	A..CC.T..A..C.A.T.AAT..TA.GG				
BCoV	G...T.....GGC...ATG.TT.T..A..ATG.....	AAGT..A..A..T.....TG				
HCoVOC43	G...T.....GGC...ATG.TT.T..A..ATG.....	AAGT..A..A..T.....TG				
MHV	G...T.....GGC...ATG.TT.T..A..TG.C.A..AGT..A..A..T..T..G					
HEV	G...T.....GGC...ATG.TT.T..A..ATGC.....	AAGT..A..A..T.....TG				
SDAV	G...T.....GGC...ATG.TT.T..A..TG...A..AGT..A..A..T..T..TG					
IBV	T.....AT..G..G.TT.T.....	AT.C.T.....T..A.TCAAC..TA.A.				
TCoV	.C..T.....AT..G..G.TT.T.....	AT.C.T.....T..A.TCAAT..TA.A.				
SARS	G...T.....A.AT.....G.TT.T.....	ATTA.....A..C..C..TA.AG				
CECoV	T...-GGA.A.GGC...ATG.TT.T..A..ATG.....	AAGT..A..C..T.....TG				
G1 ave 19	T...T.....GGC...ATG.TT.T..A..ATG.....	AAGT..A..A..T.....TG				
G2 ave 11	T...T.....GGC...ATG.TT.T..A..ATG.....	AAGT..A..A..T.....TG				
G3 ave 09	T...T.....GGC...ATG.TT.T..A..ATG.....	AAGT..A..A..T.....TG				
G4 ave 07	T...T.....GGC...ATG.TT.T..A..ATG.....	AAGT..A..A..T.....TG				

	70	80	90	100	110
CCoV	ATGCCACTGTGGTTATTGGCTCAACCAAG-TTTTATGGTGGTTGGGATAACA				
FIPV	T..C.....	T.....	C.....		
HCoV229E	C..T.....C.....A..T.....	C..G.....	T.....		
TGEV	T.....C.....T.....	C..T.....			
PEDV	GC..TT.G..T.....TA..T..T.....	C..T.....			
BCoV	G..TTC.....T.....A..A..C..T.....	C..C.....	G.T.		
HCoVOC43	G..TTC.....A.....A..A..C..T..A.....	C.....	G.T.		
MHV	G..TTC.....A.....A..A..C..G.....	C.....	G.T.		
HEV	GC.TTC.....A.....A..A..C..T..A.....	C..C.....	G.T.		
SDAV	G..TGC.....A.....A..A..C..G.....	C.....	G..		
IBV	TT.....A.....AA.....	C.....	C.....		
TCoV	TC.....A.....GA.....	C.....	C.....C..T.		
SARS	GA..T.....A.....AA.....G.....	C.....	C.....C.....T.		
CECoV	GATT.C.....T..T.A..A..C..TT..A.....	C..C.....	G.T.		
G1 ave 19	G..TTC.....T.....A..A..C..T.....	C..C.....	G.T.		
G2 ave 11	G..TTC.....T.....A..A..C..T.....	C..C.....	G.T.		
G3 ave 09	G..TTC.....T.....A..A..C..T.....	C..C.....	G.T.		
G4 ave 07	G..TTC.....T.....A..A..C..T.....	C..C.....	G.T.		

Figura 8- Alinhamento de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA- polimerase RNA-dependente (gene *pol*) entre as seqüências pertencentes aos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus Entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV), Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e os diferentes vírus recuperados após a inoculação (Grupo 1 ave 19, Grupo 2 ave 11, Grupo 3 ave 09 e Grupo 4 ave 07).

Comparando-se as seqüências dos 4 grupos experimentais e os coronavírus do grupo 2, obteve-se identidade de 99% com o coronavírus bovino, 96,3% com o coronavírus humano OC43, 90% com o coronavírus da hepatite murina, 95,4% com o vírus hemaglutinante da encefalomielite suína e 90,9% com o vírus da sialodacrioadenite, com média de identidade de 94,32 % para esse grupo .

Considerando-se o grupo 1, a identidade das seqüências referentes aos grupos inoculados com o coronavírus canino foi de 66%, com o vírus da peritonite infecciosa felina 65,7%, com o coronavírus humano 229E 76,5%, com o vírus da gastroenterite transmissível dos suínos 67,5% e com o vírus da diarreia epidêmica suína 64,8%, com media de 68,22% .

Com respeito ao grupo 3, as seqüências dos vírus recuperados nos grupos inoculados foi de 66,6% com o vírus da bronquite infecciosa das galinhas e 67,5% com o coronavírus de perus, com media de 67,05%. Finalmente, quando as seqüências dos grupos inoculados foram comparadas com o coronavírus da SARS a identidade foi de 70,2% (Tabela 4).

Tabela 4- Identidade de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) entre as seqüências pertencentes aos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus Entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV) e Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e os coronavirus recuperados após a inoculação (Grupo 1 ave 19, Grupo 2 ave 11, Grupo 3 ave 09 e Grupo 4 ave 07)

	Grupo 1					Grupo 2					Grupo 3		SARS
Vírus	HCoV 229E	PEDV	TGEV	CCoV	FIPV	HCoV OC43	HEV	BCoV	MHV	SDAV	TCoV	IBV	SARS
G1, G2, G3 e G4	76.5%	64.8%	67.5%	66.6%	65.7%	96.3%	95.4%	99.0%	90.0%	90.9%	67.5%	66.6	70.2%

Observando-se a figura 9, houve identidade em 100% dos aminoácidos nos coronavírus recuperados após a inoculação nos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4 quando comparados com os coronavírus pertencentes ao grupo 2 (BCoV, HCoV OC43, MHV, HEV e SDAV). Entretanto, quando comparados com o CECoV inoculado, houve 9 substituições de aminoácidos ($Y \rightarrow T$, $G \rightarrow M$, $N \rightarrow T$, $F \rightarrow V$, $L \rightarrow I$, $A \rightarrow G$, $P \rightarrow T$, $L \rightarrow T$, $R \rightarrow K$), exatamente nas mesmas posições de variação de aminoácidos entre o CECoV e com os coronavírus das outras espécies.

A árvore de máxima parcimônia realizada a partir das seqüências de nucleotídeos dos diferentes coronavírus dos grupos 1, 2, 3 e SARS, assim como o CECoV e os vírus recuperados dos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4, resultou em um correto agrupamento dos coronavírus segundo seus grupos, agrupou os vírus recuperados dos grupos experimentais e o vírus inoculado em um único ramo politômico entre os ramos referentes aos coronavírus do grupo 2 (Figuras 10 e 11)

Figura 10 - Árvore filogenética consenso de máxima parcimônia não enraizada utilizando as seqüências de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) dos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus Entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV), Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e os coronavírus detectados nas aves dos grupos experimentais 1 (G1 ave 19), 2 (G2 ave 11), 3 (G3 ave 09) e 4 (G4 ave 07). Os números acima de cada ramo indicam os valores de bootstrap referente ao mesmo

Figura 11. Árvore filogenética consenso de máxima parcimônia não enraizada utilizando as seqüências de nucleotídeos de um segmento do gene codificador da proteína RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) dos Coronavírus Canino (CCoV), Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (FIPV), Coronavírus Humano 229E (HCoV 229E), Vírus da Gastroenterite Transmissível dos Suínos (TGEV), Vírus da Diarréia Suína Epidêmica (PEDV), Coronavírus Bovino (BCoV), Coronavírus Humano OC43 (HCoV OC43), Vírus da Hepatite Murina (MHV), Vírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV), Coronavírus Entérico de Galinha (CECoV), Vírus da Sialodacrioadenite (SDAV), Vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), Coronavírus de Perus (TCoV), Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) e os coronavírus detectados nas aves dos grupos experimentais 1 (G1 ave 19), 2 (G2 ave 11), 3 (G3 ave 09) e 4 (G4 ave 07)

4.4.4 Histopatologia

Nas aves inoculadas por via oral e observadas pelo período de 7 dias, os fragmentos de intestino delgado apresentaram edema e exposição da lamina própria na região do ápice das vilosidades e, a luz da estrutura mostrava-se preenchida por restos celulares (Figura 12). No reto evidenciou-se dissociação do tecido conjuntivo que compõem a lamina própria e a submucosa, definindo o edema destas regiões (Figura 13). Observou-se no pâncreas degeneração focal de ácinos que mantiveram a sua expressão em todos os tempos experimentais. (Figura 14).

As lesões presentes nos intestinos e retos das aves inoculadas por via oral e observadas por 21 e 34 dias, diferiram quanto ao grau de lesão, mostrando-se mais acentuadas, expressando uma enterite necrótica, caracterizada por necrose do epitélio das vilosidades que se estendia do ápice até a região das criptas e infiltrado inflamatório na lamina própria com predomínio de células mononucleares (Figura 15). No reto notou-se proctite necrótica com exposição da lamina própria em toda extensão da estrutura, infiltrado inflamatório com predomínio de células mononucleares e edema da submucosa (Figura 16). Além desses aspectos, em alguns segmentos presenciou-se hiperplasia glandular (Figura 17).

Nas aves inoculadas por via oral e observadas pelo período de 60 dias, as lesões evoluíram assumindo caráter crônico. Na lamina própria do intestino delgado houve proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno e nesta estrutura correspondente ao reto notou-se a formação de tecido de granulação (Figura 18 e 19). No pulmão, evidenciou-se células degeneradas, permeando a rede de plasma presente na luz parabronquial e bronquial. Dissociação das fibras do tecido conjuntivo que constituem os septos lobulares e hiperplasia do tecido linfóide peribronquial (Figura 20).

O exame microscópico dos fragmentos de intestino delgado, reto e pâncreas das aves inoculadas pôr via ocular e observadas durante os períodos de 7, 21, 34 e 60 dias mostraram alterações semelhantes às descritas para os mesmos tempos experimentais das aves inoculadas pôr via oral.

As aves sentinelas inoculadas pelas vias oral e ocular revelaram alterações semelhantes às observadas para os respectivos tempos experimentais (Figura 21).

Figura 12 - Corte histológico de intestino delgado de ave inoculada pela via oral, 7 dias pós inoculação. Notar exposição da lâmina própria na região do ápice das vilosidades e restos celulares na luz. (HE.,10X)

Figura 13 - Corte histológico de reto de ave inoculada pela por via oral, 7 dias após a inoculação. Notar edema da lâmina própria e submucosa. (HE.,14X)

Figura 14 - Corte histológico de pâncreas de ave inoculada pela via oral aos 7 dias pós-inoculação. Notar degeneração vacuolar no citoplasma das células dos ácinos. (HE.,14X)

Figura 15 - Corte histológico de intestino delgado de ave inoculada pela via oral, 34 dias pós inoculação. Notar enterite necrótica caracterizada por vilosidades com exposição da lâmina própria, estendendo-se à região das criptas (HE.,14X)

Figura 16 - Corte histológico de reto de ave inoculada pela via oral aos 34 dias após a inoculação. Notar proctite necrótica com fusão das projeções da mucosa e exposição da lâmina própria. (HE.,10X)

Figura 17 - Corte histológico de intestino delgado de ave inoculada pela via oral aos 60 dias pós-inoculação experimental. Notar enterite necrótica, infiltrado com predomínio de células mononucleares, proliferação de fibroblastos e deposição de

Figura 18 - Corte histológico de reto de ave inoculada pela via oral aos 60 dias após a inoculação. Notar proctite necrótica com formação de tecido de granulação. (HE., 10X)

Figura 19 - Corte histológico de pulmão de ave inoculada pela via oral aos 60 dias pós - inoculação. Notar congestão, hemorragia e parabronquio contendo plasma. (HE., 4 X)

Figura 20 - Corte histológico de pulmão de ave inoculada pela via oral aos 60 dias pós- inoculação. Notar edema do tecido interlobular caracterizado por dissociação do tecido conjuntivo. (HE., 10X)

Figura 21 - Corte histológico de pulmão de ave sentinela (grupo 2) observada aos 60 dias. Notar hiperplasia do tecido linfóide e congestão, hemorragia e edema. (HE., 4 X)

Tabela 5 - Resultados da técnica de PCR para o gene *pol* com os achados de necropsia de acordo com os grupos experimentais e os dias pós-inoculação

Grupo	TECIDO	DIAS POS-INOCULAÇÃO							
		7		21		34		60	
		PCR	Histopatologia	PCR	Histopatologia	PCR	Histopatologia	PCR	Histopatologia
1	Pâncreas	(0/3)	(1/3) Degeneração vacuolar difusa	(0/6)	NDN	(1/6)	(0/2) NDN	(0/2)	(1/1) necrose acinos
	Intestino	(0/3)	(2/3) Exposição lâmina própria e descamação epitélio no ápice das vilosidades	(0/6)	NT	(0/6)	(2/2) Enterite e hiperplasia das vilosidades	(0/2)	(1/1) Enterite necrotica
	Reto	(3/3)	(2/3) Edema da lâmina própria e dilatação de linfáticos	(0/6)	(1/1) Exposição e edema da lâmina própria dilatação linfatic.	(1/6)	(1/2) Exposição da lamina própria	(1/2)	(1/1) proctite necrotica
	Pulmão	(1/3)	(2/3) Congestão	(1/6)	(1/1) Congestão	(1/6)	(2/2) Congestão e hemorragia	(0/2)	(1/1) Hemorragia e edema. Hiperplasia tec. linf. peribronqu.
2	Pancreas	(0/1)	NT	(0/2)	NDN	(0/2)	(1/2) Degeneração focal de acinos	(0/3)	(1/1) necrose de acinos
	Intestino	(0/1)	(1/1) Exposição e edema da lâmina própria e descamação epitélio.	(1/2)	(1/1) Exp. lâmina própria e descam. epitélio. Enterite com predominância mononucleares	(2/2)	(1/2) Enterite necrotica	(0/3)	(1/1) Enterite necrotica
	Reto	(1/1)	(1/1) Edema da submucosa e hiperplasia glandular	(0/2)	(1/1) Edema da lâmina própria e dilatação de linfáticos	(2/2)	(2/2) Edema, dilatação linfát. e congestão lamina própria / necrose epitélio	(0/3)	(1/1) Exp. total lamina própria e proctite necrotica
	Pulmão	(0/1)	NT	(0/2)	(1/1) Congestão	(1/2)	(1/2) Congestão e hemorragia	(1/3)	(1/1) Hemorragia e edema. Hiperplasia tec. linf. peribronqu.
3	Pâncreas	(0/3)	Não analisada	(1/6)	(2/2) Degeneração vacuolar	(0/6)	(1/3) Degeneração focal de acinos	(0/2)	NT
	Intestino	(0/3)	Não analisada	(1/6)	(1/2) Enterite necrotica	(0/6)	(2/3) Enterite necrotica	(0/2)	NT
	Reto	(0/3)	Não analisada	(1/6)	(1/2) necrose total	(0/6)	(3/3) Proctite necrotica com exposição epitelial	(0/2)	NT
	Pulmão	(0/3)	Não analisada	(1/6)	NT	(3/6)	(3/3) Congestão e hemorragia	(0/2)	NT
4	Pâncreas	(0/1)	NT	(0/2)	NT	(2/2)	(1/2) necrose de acinos	(0/3)	NT
	Intestino	(0/1)	(1/1) Exposição lâmina própria e descamação epitelial	(0/2)	NT	(2/2)	(2/2) enterite necrotica	(0/3)	NT
	Reto	(1/1)	(1/1) Edema da lâmina própria	(0/2)	NT	(2/2)	(2/2) Ausência total de epitélio	(0/3)	NT
	Pulmão	(0/1)	(1/1) Congestão	(0/2)	NT	(2/2)	(2/2) Congestão e hemorragia	(0/3)	NT

NT: Não testado NDN: Nada digno de nota

PCR: Número de positivos/ Número de aves necropsiadas

HISTOPATOLOGIA: número de amostras com alterações histopatológicas/ Numero amostras testadas para histopatologia

GRUPO	Ave	7 dpi				21 dpi				34 dpi				60 dpi			
		p	i	r	pl	p	i	r	pl	p	i	r	pl	p	i	r	pl
1	2	N/NT	N/P	P/NT	N/P												
	3	N/P	N/P	P/P	N/P												
	4	N/N	N/N	P/P	P/N												
	20					N/N	N/NT	N/P	P/P								
	22									P/N	N/P	N/P	P/P				
	333									N/N	N/P	P/NT	N/P				
	19													N/P	N/P	P/P	N/P
2	1	N/NT	N/P	P/P	N/NT												
	178					N/N	P/P	N/P	N/P								
	11									N/P	P/NT	P/P	N/NT				
	12									N/N	P/P	P/P	P/P				
	15													N/P	N/P	N/P	P/P
3	49					N/P	P/P	N/NT	N/NT								
	63					P/P	N/NT	P/P	P/NT								
	62									N/N	N/P	N/P	P/P				
	84									N/N	N/N	N/P	P/P				
	118									N/P	N/P	N/P	P/P				
4	07	N/NT	N/P	P/P	N/P												
	13									P/NT	P/P	P/P	P/P				
	120									P/P	P/P	P/P	P/P				

Resultado na PCR / Resultado na Histopatologia.

p = pâncreas; i= intestino; r= reto; pl = pulmão.

P= positivo N= negativo

NT = Não Testado

Quadro 5 - Relação entre os resultados da reação de PCR e os achados histopatológicos nos diferentes grupos experimentais, aves e órgãos nos dias 7, 21, 34 e 60 pós-inoculação

5 DISCUSSÃO

Um coronavírus foi detectado no conteúdo intestinal e em amostras de fezes de cama de matrizes pesadas de uma granja localizada no Estado de São Paulo entre a segunda e a trigésima semana de idade, através da aplicação de uma reação de técnica da RT-PCR dirigida à amplificação de um segmento de 136 pares de base do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente dos coronavírus. A proteína não-estrutural RNA-polimerase RNA-dependente está diretamente envolvida nos processos de transcrição de mRNAs subgenômicos e de replicação do genoma viral altamente conservada, sendo, portanto, uma proteína essencial ao vírus; assim sendo, é esperado que a identidade entre o gene que a codifica entre as várias espécies de coronavírus seja alta e que pouco polimorfismo seja encontrado. Dessa forma, o direcionamento de um método de diagnóstico baseado na detecção deste gene é a abordagem mais lógica para que sejam detectados coronavírus sem restrição da espécie viral ou da espécie do hospedeiro em questão (STEPHENSEN et al., 1999). Entretanto, como os primers 4Bm, 2Bp, CV2L e CV2U foram desenhados para regiões altamente conservadas dentro do gene *pol*, não há possibilidade de, apenas através da positividade pela amplificação de produtos de PCR, caracterizar um coronavírus por este método encontrado.

Embora coronavírus já tenham sido achados no conteúdo intestinal de aves domésticas, todos pertencem ao grupo 3, ou seja, o coronavírus da bronquite infecciosa das galinhas, coronavírus de faisões e coronavírus de perus (DHINAKAR; JONES, 1997; CAVANAGH et al., 2001; CAVANAGH et al., 2002). O único relato conhecido de infecção natural de um coronavírus do grupo 2 em aves refere-se ao vírus da pufinose, um coronavírus achado em aves marinhas (*Puffinus puffinus*) na Inglaterra (NUTTAL; HARRAP, 1982; KLAUSEGGER et al.,

1999), que causa dermatite. Entretanto, o coronavírus bovino, pertencente ao grupo 2 foi demonstrado experimentalmente capaz de infectar galinhas (ISMAIL et al., 2001).

Assim sendo, para conseguir-se uma correta caracterização do coronavírus encontrado, fez-se necessário o seqüenciamento do fragmento obtido e a aplicação da seqüência a métodos de reconstrução filogenética. O seqüenciamento do DNA complementar obtido por PCR a partir de amostra de conteúdo intestinal de uma das aves de duas semanas de idade produziu uma seqüência de 113 nucleotídeos do gene *pol*, a qual, quando comparada com seqüências disponíveis no Genbank através de BLASTn, retornou apenas seqüências referentes a coronavírus do grupo 2. O alinhamento entre a seqüência do CECoV e as correspondentes derivadas de coronavírus dos grupos 1, 2, 3 e o coronavirus causador da SARS mostrou uma maior identidade de nucleotídeos com os coronavirus do grupo 2 (máxima de 87,5 % para o coronavírus bovino e mínima de 78,5% para o coronavírus da hepatite murina, com média de 83,18%). Para o grupo 3, onde se classificam os coronavírus comumente encontrados em aves, a identidade máxima foi de 58,0% para o coronavírus de perus e 57,1% para o vírus da bronquite infecciosa das galinhas, com média de 57,55%. Finalmente, para o grupo 1, a identidade máxima foi de 69,9% para o coronavírus humano 229E e mínima de 56,2% para o vírus da diarreia suína epidêmica, com média de 60,2%. O fragmento utilizado para o seqüenciamento foi produzido em uma reação de PCR na qual não se evidenciaram bandas inespecíficas e nem bandas nos controles negativos e controles inseridos na fase de nested para se monitorarem contaminações por DNA amplificado. Assim sendo, descarta-se a ocorrência de contaminações entre a amostra Kakegawa e as amostras fecais. Dessa forma, o coronavírus encontrado tem maior identidade de nucleotídeos com os coronavirus do grupo 2 segundo a porção do genoma analisada, sendo, assim divergente dos

coronavírus esperados em aves comerciais. Entretanto, mesmo quando comparado o CECov com os coronavírus do grupo 2, observou-se divergência entre este e os membros deste grupo. A falta de identidade entre duas ou mais seqüências de nucleotídeos é devida primariamente a mutações por substituição, deleção ou inserção em uma ou mais posições nas seqüências em questão. Observando-se a região de alinhamento mostrada na figura 3, constatam-se 3 eventos de inserção/deleção na seqüência referente ao CECov (posições 10, 79 e 90 do alinhamento) além de 5 substituições exclusivas do CECov; afora estes eventos, podem ser observadas substituições de nucleotídeos distribuídas ao longo de toda a seqüência. Mutações em nucleotídeos podem causar troca do aminoácido codificado pelo códon onde se deu a mutação ou resultar em códons de parada (mutações não sinônimas) ou não levar a alterações em aminoácidos (mutações sinônimas) (LI, 1997). Assim, foi necessário que fosse realizado o estudo das seqüências em termos de aminoácidos, traduzidos a partir das seqüências de nucleotídeos após a aferição do passo de leitura das mesmas para a verificação de mutações sinônimas e não-sinônimas. Dentre as 6 mutações não sinônimas exclusivas à proteína RNA-polimerase RNA-dependente do CECov, 3 podem modificar a estrutura e funcionamento do vírus, por ter acontecido troca de polaridade: metionina (apolar) para glicina (apolar/polar), tirosina (polar) para leucina (apolar) e glicina (polar/apolar) para alanina (apolar). Dentre as outras três mutações não sinônimas encontradas em áreas variáveis da proteína, duas delas podem levar a alterações na estrutura e/ou função da proteína: serina ou treonina (polares) para prolina (apolar) e serina ou treonina (polares) para leucina (apolar). Levando-se em conta as afirmações anteriores e analisando-se o fato das aves matrizes não estarem apresentando sintomas agudos, e só apresentarem uma despigmentação, podem ser estabelecidas três possíveis teorias com respeito às mutações

encontradas: a primeira delas, é que, como o vírus estava presente no lote de aves, estava ocorrendo replicação e transcrição nas células do hospedeiro infectado e, portanto, a RNA-polimerase RNA-dependente estava funcionalmente íntegra apesar das mutações de aminoácidos. Outra possibilidade é que o vírus tenha-se tornado menos virulento pelas mudanças na polaridade dos aminoácidos, levando a alterações estruturais na proteína e modificações na replicação de RNA, alterações na tradução de novas proteínas ou na transcrição de RNA a RNA. Ainda, existe a possibilidade de que essas mutações tenham sido originadas por erros na reação de seqüenciamento, visto que a transcriptase reversa e a Taq polimerase não têm capacidade de “proof-reading”, podendo gerar substituições permanentes de nucleotídeos na seqüência (MALET, 2003; ZHANG, 2003). As três posições de aminoácidos que são grupo específicas para os coronavírus do grupo 2 (G na posição 4, metionina na posição 6 e ácido aspártico na posição 36 no alinhamento de aminoácidos) e que são consideradas marcadores para os coronavírus do grupo 2 (referência) estão também presentes no CECoV, aproximando-o ainda mais deste grupo. O fato da topologia da árvore filogenética ter resultado no agrupamento esperado para as diferentes espécies de coronavírus em seus respectivos grupos, árvore esta obtida a partir de um segmento de 113 nucleotídeos referentes ao gene *pol*, o tamanho de seqüência obtido para o CECoV, valida tanto a estratégia de seqüenciamento em relação à região escolhida para a filogenia quanto o método de reconstrução filogenética (máxima parcimônia) utilizados para a caracterização do CECoV. Assim, o CECoV foi agrupado no mesmo nó do coronavírus bovino, dentro do grupo 2. A PCR para a amplificação do gene HE, exclusivo dos coronavírus do grupo 2, resultou em um fragmento de aproximadamente 600 pb, comparando-se com um marcador de tamanho molecular de 100 pb. Este tamanho de banda é inferior aos

esperados, 796 ou 826 pb. O fato de haverem dois tamanhos possíveis de fragmentos já indica que essa região possa ser susceptível à deleções, portanto é possível que a detecção de um fragmento amplificado de um tamanho menor do que os esperados poderia ser devido a deleções ocorridas na região interna de hibridização dos primers. Genes que codificam para os genes de envelope dos coronavírus são conhecidos por sua susceptibilidade a deleções. Por exemplo, o coronavírus respiratório dos suínos (PRCoV) possui uma deleção de até 681 nucleotídeos no gene codificador da proteína S quando comparado com o vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV). Esta deleção permitiu o desenvolvimento de uma reação de PCR para um diagnóstico diferencial entre os dois vírus, utilizando o mesmo enfoque aqui apresentado (VAUGHN et al, 1995; KREMP et al, 1997; PATON et al, 1997; YOO et al, 2000). O seqüenciamento deste fragmento não produziu uma seqüência viável de nucleotídeos. É possível que esta falha no seqüenciamento seja devida a, principalmente, perdas de DNA durante a etapa de purificação de DNA a partir do gel de agarose, o que pode ter levado a uma baixa concentração de DNA – alvo para a reação de terminação. O fato de o CECoV, após quatro passagens sucessivas em células de cultivo primário de fibroblastos de embrião de galinha e células de linhagem VERO, não ter produzido nenhum tipo de efeito citopático, nem ter apresentado nenhum resultado positivo após ser submetido a cada passagem à PCR para amplificar o gene *pol* dos coronavírus, é indicativo que o vírus não estava replicando-se nas células utilizadas e portanto não havia sido isolado. O CECoV não apresentou efeitos citopáticos em FEG e em células VERO, devido provavelmente, à ausência de receptores de membrana específicos para as proteínas do envelope. Como as amostras eram de campo, poderia ser necessário um número de passagens maior para a adaptação. Os ovos embrionados são um meio

adequado para o isolamento de diferentes vírus, tanto de mamíferos como de aves. Dependendo do tropismo do vírus pode ser necessário trabalhar por uma ou outra das diferentes vias de inoculação. No caso do coronavírus entérico das galinhas (CECoV), como as suas exigências eram desconhecidas, foram utilizadas tanto a via alantóide como a via corioalantoide para a inoculação do mesmo, visto serem estas as mais utilizadas para o isolamento viral. Após quatro passagens sucessivas em cavidade alantóide e três em membrana corioalantóide, não observou-se alterações nos embriões, nem detectou-se o vírus pela reação de PCR para a amplificação do gene *pol* dos coronavírus. No caso do vírus da bronquite infecciosa das galinhas, geralmente após três passagens sucessivas observa-se alteração morfológica do embrião como nanismo e enrolamento do embrião, quando a amostra de campo é positiva para este vírus. Como o isolamento do CECoV não foi conseguido, o mais provável é que este vírus não tenha tropismo por ovos embrionados, talvez pelas diferenças nas proteínas de envelope em relação aos coronavírus aviários do grupo 3. Há também a possibilidade de que a amostra de campo do CECoV necessitasse mais do que quatro passagens em ovos embrionados. A inoculação experimental do vírus detectado nas amostras de campo em aves SPF da linhagem leghorn de 5 e 25 dias de idade, tanto pela via oral como ocular respectivamente, levou ao aparecimento de diarreia a partir do terceiro dia após a inoculação, indicando um período de incubação de aproximadamente 72 horas. Levando em conta que o tempo de transito intestinal nas aves da linhagem Leghorn é de 7 horas e meia aproximadamente (DENBOW, 2000), o vírus inoculado teria sido eliminado nesse período, caso não houvesse ligação com receptores nas células intestinais, sem o aparecimento de sintomas entéricos. Confirmando a excreção continuada via fecal do vírus inoculado e por tanto sua replicação no intestino, um pool de amostras fecais colhidas do grupo 3 das aves vivas,

mostrou-se positivo para a presença de coronavírus em PCR neste momento. Este período de incubação é semelhante ao período de incubação observado em coronavírus que causam enterite e diarreia, como por exemplo, o coronavírus bovino, com períodos de incubação de 96 horas (KAPIKIAN, 1994). A mesma quadro de diarreia que foi observada nos grupos inoculados no período de três dias após a inoculação, também foi observado nos grupos sentinela 2 e 4, sendo que o pool de fezes do grupo sentinela 2 apresentou resultado positivo para coronavírus na PCR. Estes resultados sugerem que houve transmissão horizontal, pois as aves tornaram-se infectadas.

O fato de o coronavírus ter sido encontrado nas fezes de um grupo sentinela é sugestivo de que o coronavírus inoculado nas aves dos grupos 1 e 3 tenha se transmitido para este grupo, devido provavelmente por estas aves terem sido alojadas entre os dois grupos inoculados. Os coronavírus de um modo geral transmitem-se eficientemente através de aerossóis e de fômites contaminados com partículas infecciosas, podendo adentrar a um novo hospedeiro tanto pela mucosa do trato respiratório quanto do trato digestivo. Entre tanto, o vírus pode ser isolado frequentemente do trato respiratório e pode ser excretado pelas secreções nasais e intestinais (McNULTY et al., 1984). Assim, é possível que as aves inoculadas com o coronavírus e nas quais este estava se replicando tenham eliminado o vírus por secreções nasais sob a forma de aerossóis, os quais atingiram as aves alojadas nos boxes adjacentes, levando ao aparecimento dos sintomas descritos. Ainda, uma vez que o manejo das aves era feito de modo indistinto entre os grupos experimentais, com o intuito de se simularem as condições encontradas em criações comerciais de aves, partículas infecciosas do coronavírus podem ter sido transportadas de um grupo a outro por meio de materiais de limpeza, roupas e calçados. O fato de o grupo 4 (sentinela) e o grupo 1, não terem sido encontrados excretando o vírus 3 dias após a inoculação,

sendo negativos na PCR pode ser devido à ausência de transmissão aerógena para estes grupos até este momento, visto que estes grupos foram alojados em gaiolas não intercaladas aos grupos inoculados, o que diminuiria a transmissão ave-a-ave. Ainda, é possível que, mesmo tendo havido infecção nas aves deste grupo, as partículas virais não fossem suficientes para serem detectadas pela PCR. Ainda, é necessário que se considere a ocorrência de falhas na reação de PCR em si: perda de material nas etapas de extração de RNA e/ou de transcrição reversa, mudanças sucessivas na temperatura devido a congelamento e descongelamento das amostras, levando à degradação da partícula viral e seu RNA, ação de inibidores inespecíficos como RNases. Deve-se levar em conta também, a possibilidade de excesso de DNA/RNA na amostra (RASOOL et al., 2002; WINIARCZYK et al., 2002). A partir deste momento experimental e até o final da primeira quinzena do experimento, os sintomas observados predominantemente nas aves dos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4 foram compatíveis com processos patológicos entéricos, como por exemplo, despigmentação em pernas e bico, palidez em cristas e barbelas, depressão, penas arrepiadas, assim como heterogeneidade no crescimento no grupo 1 e 3 sintomas que podem ser associados à má absorção primária, ou seja, por perda de vilosidades no intestino delgado (KAPIKIAN, 1994). Esses sintomas são similares aos relatados na granja de onde foram originárias as fezes das quais foi feito o inóculo. Após os primeiros quinze dias da inoculação, não foi evidenciada diarreia em nenhum dos grupos nem outro sinal além de heterogeneidade de tamanhos e despigmentação de cristas, barbelas e pernas até o fim do experimento. Os grupos 5 e 6 não evidenciaram sinais, possivelmente porque os boxes onde estas aves estavam alojadas estavam mais distantes do que os dos grupos sentinela 2 e 4 das principais fontes de infecção que eram os grupos inoculados 1 e 3. Portadores assintomáticos de coronavírus são relatados e podem

ser uma explicação plausível para a ausência de sinais clínicos severos, uma vez que a infecção no lote persistiu por pelo menos um período de 16 semanas. Além disso, as matrizes comerciais adultas poderiam comportar-se como reservatórios para aves jovens. Pois, os neonatos são os mais afetados pelos coronavírus ou também aves adultas no pico da produção de ovos (MOSTL, 1990). Outros fatores como idade, nutrição, manejo e co-infecções poderiam ter aumentado ou poderiam ter sido predisponentes para uma doença mais severa causada por CECoV. No presente experimento, nem a idade das aves inoculadas (5 e 25 dias), nem a via de inoculação (oral e ocular) levaram a diferenças quanto a apresentação de sinais clínicos ou no resultado de positividade na PCR. Rotavírus, conhecido como um agente causador de enterites em frangos, não foi achado como co-infecção nas aves de acordo com os resultados de PAGE. De acordo com o quadro 5, a maior concordância entre presença do coronavírus inoculado, indicado pelo PCR, e presença de lesão histopatológica, deu-se no reto: das 5 amostras desse órgão, colhidas nos diferentes grupos experimentais e positivas à prova da PCR no dia 7 após a inoculação, todas apresentaram a mesma lesão microscópica, como, por exemplo, edema de submucosa, exposição e edema da lâmina própria com dilatação de vasos linfáticos e hiperplasia glandular. Estas lesões na histologia do reto são concordantes com o tropismo e a patogenia de coronavírus entéricos dos grupos 1, 2 e 3 que acometem mamíferos e aves, nos quais estes vírus levam, por replicação em enterócitos das vilosidades, à necrose e descamação celulares e conseqüente atrofia epitelial com exposição de lâmina própria, com hiperplasia da região de criptas intestinais. Como conseqüência, há desvio da atividade predominantemente absorptiva da região acometida para uma maior atividade secretória, culminando em diarreia osmótica (KAPIKIAN, 1994). A observação microscópica de dilatação de vasos linfáticos é um achado indicativo de um processo

inflamatório inicial, uma vez que estes vasos participam do sistema imunológico das aves absorvendo antígenos de tecidos e estes antígenos podem ativar células que se encontram ao redor destes (KING et al, 1984). Dessa forma, a associação do resultado positivo do PCR com as alterações microscópicas indicativas de um processo inflamatório em andamento sugere que, além da presença de RNA viral, havia a replicação do coronavírus inoculado. Considerando o período de 7 dias pós-inoculação, observaram-se em 4 amostras de intestino delgado, com PCR negativo, alterações microscópicas, como exposição de lâmina própria, descamação epitelial no ápice das vilosidades e enterite com predominância de células mononucleares. Estes achados são então também concordantes com um processo inflamatório causado pelo vírus. Como todas as amostras com lesão microscópica foram negativas para coronavírus, é possível que a infecção pelo vírus inoculado tenha ocorrido apenas nos dias iniciais pós-inoculação, causando as lesões mencionadas. Aos 21 dias pós inoculação, o padrão de lesões em tecido retal se manteve, mas, nos retos com lesão (2 amostras), o vírus não foi mais encontrado por PCR, sugerindo que a infecção diminuiu ou se deteve mas a lesão permaneceu no tecido, impedido a regeneração dos vilos, por ter sido afetada a região das criptas. Neste mesmo momento experimental, os pulmões analisados (4) apresentaram a mesma alteração evidenciada no dia 7 pós inoculação, sendo que apenas um deles foi positivo por PCR, sugerindo mais uma vez que a via respiratória tem um papel importante na transmissão do vírus. Ao mesmo tempo, foram encontradas duas amostras de intestino delgado positivas na PCR e com lesão patológica indicando que a replicação viral encontrava-se ativa. No período de 34 dias pós-inoculação, a relação entre presença do vírus e lesão histopatológica compatível com replicação viral manteve-se mais acentuada em amostras de reto e intestino, sendo que as lesões tornaram-se mais acentuadas, estendendo-se até a região das

criptas. Houve, também, uma alta frequência de positividade por PCR em pulmões com lesões histopatológicas, mas os tipos de lesão encontrados neste órgão (congestão e hemorragia) podem ser atribuídas à ação tóxica do clorofórmio utilizado para a eutanásia das aves, sendo entretanto a presença do vírus indicativa de que a mucosa respiratória possa ser uma porta de entrada para o vírus. No ultimo momento experimental (60 dias após a inoculação) houve predomínio de tecidos com lesão, mas negativos quanto a presença do vírus, havendo a cronificação das lesões em pulmão, reto e intestino, visto que houve proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno na lâmina própria do intestino delgado, formação de tecido de granulação no reto e, nos pulmões evidenciaram-se células degeneradas, rede de plasma na luz parabronquial e bronquial e dissociação das fibras do tecido conjuntivo, indicando que a infecção tenha persistido e as aves não se recuperaram das lesões nos tecidos. No caso de alguns órgãos com lesões patológicas onde o vírus não foi encontrado, sugere-se que o fragmento colhido para PCR não tivesse vírus, mas apresentasse lesão, ou que o mesmo vírus estivesse presente num título abaixo do limiar de detecção do PCR. Ainda, como já comentado para o caso de tecido retal, há a possibilidade de que infecção viral tenha cessado mas as lesões tenham persistido. Paralelamente, órgãos com resultado positivo no PCR, mas sem lesão aparente no exame histopatológico podem ser um exemplo da disseminação sistêmica do RNA viral sem a existência de partículas virais infecciosas disseminando, por exemplo, células fagocitárias; cabe aqui também a sugestão da diferença entre fragmentos testados para PCR e histopatologia em um mesmo órgão.

Macroscopicamente, as lesões encontradas em intestino e reto são também concordantes com enterite causada por infecção viral, como hiperemia em reto e intestino delgado. Como indicado na tabela 5 (PCR), o vírus foi encontrado em conteúdo intestinal procedente da porção

duodenal, de forma intermitente durante todo o experimento (60 dias), o que indica que o mesmo estava sendo excretado via fezes, aumentando seu potencial de transmissão. O grupo sentinela 6, não inoculado nem com vírus nem com PBS, quando testado pela PCR em um pool de conteúdo entérico, apresentou-se positivo, indicando que o vírus se transmitiu também para esse grupo, mas de forma tardia ou pouco intensa, visto que as aves não apresentaram sinais clínicos e apresentaram PCR negativos nos diferentes órgãos examinados. Essa mesma explicação é cabível ao encontrado em relação ao grupo 5, no qual nem em órgãos nem em conteúdo entérico o vírus foi evidenciado. Quando comparados os vírus recuperados dos diferentes grupos experimentais 1, 2, 3 e 4, quanto ao segmento de 136 pb do gene *pol* (item 3.1.3, 3.1.6 e 3.1.7) as identidades de nucleotídeos foi de 100% entre um grupo e outro (Tabela 3), sendo indicativo que o mesmo vírus estava circulando entre os diferentes grupos de aves. Quando essas seqüências foram submetidas ao BLASTn, retornaram apenas seqüências referentes a coronavírus do grupo 2, o que confirma a identidade do vírus detectado. Quando comparadas as seqüências de nucleotídeos dos grupos experimentais com o vírus presente no inóculo, a identidade foi de 88,3%. A discrepância entre o vírus inoculado e o recuperado dos grupos experimentais é mais provavelmente devida a uma reação de seqüenciamento e análise de seqüência mais acuradas para os vírus experimentais do que do vírus inoculado em cuja seqüência podem ter havido falhas na reação do seqüenciamento ou na interpretação dos cromatogramas. Isto é justificado quando se comparam os vírus dos grupos experimentais 1, 2, 3 e 4 com os outros coronavírus do grupo 2, visto que a identidade média dos nucleotídeos aumentou de 83,18% para 94,32 %, atingindo o máximo de 99% com o BCoV. Além disso, houve identidade de 100% com as seqüências de aminoácidos pertencentes aos coronavírus achados nos grupos inoculados e com os coronavírus do grupo 2. Comparando-se

com o grupo 1, a identidade média de nucleotídeos passou de 60,2% para 68,22% e com o grupo 3, a identidade média de nucleotídeos passou de 57,55% para 67,05%. A árvore filogenética de máxima parcimônia demonstrou que as 4 seqüências dos grupos experimentais ficaram num grupo monofilético ao vírus inoculado (CECoV) em um ramo politômico que abriga estas cinco seqüências inseridas no grupo 2 dos coronavírus, mas agora em um outro ramo separado do BCoV, quando comparado à árvore original sem as seqüências dos grupos inoculados (Figuras 5, 6, 10 e 11). A monofilia confirma os achados que indicaram alta identidade com os vírus recuperados e o vírus inoculado e a politomia encontrada é mais provavelmente uma politomia do tipo profunda, visto a alta identidade entre as seqüências e o fato de que o vírus inoculado e os recuperados são os mesmos (PAGE; HOLMES, 1998). A topologia gerada por essa árvore é consistente, visto que cada espécie de coronavírus foi novamente agrupada corretamente. As seqüências foram obtidas a partir de amplicons produzidos em reações de nested-PCR nas quais os controles para monitoração de contaminação para DNA amplificado não apresentaram nenhum tipo de bandas. Cada fase da PCR (extração de RNA, preparo de mix, primeira amplificação, nested de PCR e eletroforese) foi realizada em ambientes separados, com materiais exclusivos para cada ambiente. Deste modo, é descartada a possibilidade de contaminação, quer seja entre amostras, quer seja com o controle positivo. A PCR procurando a amplificação do gene *pol* dos coronavírus, realizada em um pool de embriões da mesma procedência das aves SPF inoculadas, não mostrou a presença de coronavírus, o que certifica a origem das aves inoculadas como negativas para este vírus. Ainda, quando tomadas amostras das aves antes do desafio, a PCR foi negativa. Isto demonstra que as aves encontravam-se negativas para coronavírus antes da inoculação experimental. Somando os dados até agora discutidos, tem-se que a região

seqüenciada de 113 nucleotídeos da porção 5'do ORF1b do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente dos coronavírus, que é traduzida em 36 aminoácidos desta proteína, permite que o vírus em questão seja classificado dentro do grupo 2 da família Coronaviridae, quando esse segmento específico é utilizado para a reconstrução de filogenia. Sabe-se que os coronavírus são vírus amplamente susceptíveis a recombinações no seu gene *pol*, o que torna possível que um determinado coronavírus seja homólogo a um certo grupo, quando a filogenia é realizada com um segmento deste gene, e a outro grupo quando o segmento do gene *pol* estudado é outro. Esta possibilidade foi aferida de modo prático para o coronavírus causador da SARS, o qual foi demonstrado como monofilético ao grupo 3 dos coronavírus quando analisada uma porção 3'do gene *pol*, mas, paralelamente, quando o segmento analisado estava na porção 5'do mesmo gene, este vírus foi observado como um grupo irmão dos coronavírus dos grupos 1, 2 e 3, o que se explica por recombinações independentes entre diferentes segmentos deste gene (REST et al., 2003). A análise do segmento do gene *pol* utilizado, localizado na ORF1b, em direção da porção 3' deste gene permitiu que este vírus fosse classificado dentro do grupo 2 dos coronavírus quando seu genoma é analisado de modo completo. No entanto, pode ter ocorrido um evento de recombinação entre o coronavírus do grupo 2 e coronavírus aviários clássicos em uma ocorrência de salto interespecies. Este não é um evento incomum na família Coronaviridae, pois o vírus da pufinose é um coronavírus do grupo 2 que foi isolado de aves marinhas e sua origem é associada a um salto de hospedeiro mamífero-ave (REST; MINDEL , 2003). Quanto à origem dos vírus envolvidos no possível evento de recombinação, têm-se as seguintes teorias: uma vez que as medidas de biossegurança na exploração de matrizes comerciais são extremas, reduz-se a probabilidade de que tenha havido contato entre as aves e uma outra espécie animal que não o

homem; assim, pode-se pensar que um coronavírus possa ter entrado em contato com as aves via seres humanos (médicos veterinários, tratadores etc), que tenha entrado em contato com, por exemplo, bovinos ou suínos acometidos por coronavírus. Ainda, deve ser lembrado que os coronavírus, como, por exemplo, o coronavírus humano OC43, são a segunda principal causa de resfriados em seres humanos (MAKELA et al., 1998) e, uma vez que como norma, qualquer pessoa que ingresse na granja, deve evitar o entrar em contato com qualquer exploração de aves por pelo menos 4 dias, torna-se real a possibilidade de que esta tenha sido a fonte do vírus doador do segmento homólogo aos coronavírus do grupo 2 no vírus aqui descrito, visto que a recombinação entre coronavírus de grupos diferentes é um efeito factual e não uma possibilidade distante (REST; MINDELL, 2003; WU et al., 2003). O fato de este coronavírus ter sido achado no mesmo lote após 28 semanas, demonstra que o vírus persiste, mais provavelmente devido a uma infecção e replicação do mesmo do que a uma exposição continuada a um vírus exógeno. É de vital importância que o CECoV, seja amplamente caracterizado, por meio de seqüenciamento de todo o gene 1, codificante da poliproteína que resulta na RNA-polimerase RNA dependente e incluindo-se genes codificadores de proteínas mais polimórficos como a proteína S, M, HE e o segmento 3' UTR, desde que não foi possível um seqüenciamento do gene da proteína HE, mesmo conseguindo-se produto amplificado na reação de PCR. Ainda, um estudo a campo mais amplo buscando a ocorrência do vírus aqui encontrado e relacionando-o enfermidades aviárias de base entérica ou não e em associação com outros vírus aviários permitirá um maior entendimento do impacto do mesmo sobre a produção avícola.

6 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu obter as seguintes conclusões:

- A reconstrução filogenética baseada em um segmento de 113 nucleotídeos do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente permitiu caracterizar o coronavírus encontrado em conteúdo entérico de aves matrizes de corte como pertencente ao grupo 2 dos coronavírus.
- Quando inoculado em aves White Leghorn SPF, tanto por via oral quanto por via ocular, o coronavírus encontrado provocou sintomas clínicos, lesões macroscópicas e histopatológicas predominantemente entéricos.
- O coronavírus encontrado transmite-se de modo eficiente entre aves inoculadas e aves sentinela a partir de, pelo menos, três dias após a inoculação tanto por via ocular como por via oral.

REFERENCIAS

- AKASHI, H.; INABA, Y.; MIURA, Y.; TOKUHISHA, S.; SATO, K.; SATODA, K. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 5, p. 265-276, 1980.
- BARNES, H. J. Viral enteric infections. In: SAIF, Y. F. **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames, IA: Iowa state University Press. 1997. p. 685-686.
- BEAUDETTE, F. R.; HUDSON, C. B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 90, p. 51-60, 1937.
- BOS, E. C. W., LUYTJES, W., VAN DER MEULEN, H.; KOERTEN, H. K.; SPAAN, W. J. M. The production of recombinant infectious DI – particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. **Virology**, v. 218, p. 52-60, 1996.
- BRADBURNE, A. F.; SOMERSET, B. A. Coronavirus antibody titers in sera of healthy adults and experimentally infected volunteers. **The Journal of Hygiene**, v. 70, p. 235-244, 1972.
- BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M. B.; LIMA, C. H. A.; ROSALES, C. A. R.; RUIZ, V. L. A.; JEREZ, J. A. Animal coronaviruses. **Virus Reviews and Research**, v. 1, n. 6, p. 7-13, 2001.
- BRESLIN, J. J.; SMITH, L. G.; FULLER, F. J.; GUY, J. S. Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid gene and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. **Virus Research**, v. 65, p. 187-198, 1999.
- CAVANAGH, D. The coronavirus surface glycoprotein In: SIDDELL, S. G. **The coronaviridae**. New York: Plenum, 1995. p. 73-113.
- CAVANAGH, D.; NAQI, S. Infectious bronchitis. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames, IA: Iowa State University Press, 1997. p. 511-526.
- 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. de 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.

CLARK, M. A. Bovine coronavirus. **British Veterinary Journal**, v. 149, n. 1, p. 51-70, 1993.

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.

COMPTON, S. R.; VIVAS-GONZALEZ, B. E.; MACY, J. D. Reverse transcriptase polymerase chain reaction-based diagnosis and molecular characterization of a new rat coronavirus strain. **Laboratory Animal Science**, v. 49, n. 5, p. 506-513, 1999.

DE GROOT, R. J.; VAN LEER, R. W.; DALDERUP, M. J.; VENNEMA, H.; HORZINEK, M. C.; SPAAN, W. J. Stably expressed FIPV peplomer protein induces cell fusion and elicits neutralizing antibodies in mice. **Virology**, v. 171, p. 493-502, 1989.

DENBOW, M. Gastrointestinal anatomy and physiology. In: WHITTOW, C. **Avian physiology**. 5^A edição. Academic Press. 2000. p. 299-325.

DHINAKAR, G.; JONES, R. C. Infectious bronchitis virus: immunopathogenesis of infection in the chicken. **Avian Pathology**, v. 26, p. 677-706, 1997.

GODET, M.; GROSCLAUDE, J.; DELMAS, B.; LAUDE, H. Major receptor-binding and neutralization determinants are located within the same domain of the transmissible gastroenteritis virus (coronavirus) spike protein. **Journal of Virology**, v. 68, p. 8008-8016, 1994.

GOUGH, R. E.; COX, W. J.; WINKLER, C. E.; SHARP, M. W.; SPACKMAN, D. Isolation and identification of infectious bronchitis virus from pheasants. **Veterinary Record**, v. 138, p. 208-209, 1996.

GUY, J. S.; BARNES, 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. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 77, p. 1166-1175, 1998.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, p. 473-477, 1982.

HOLMES, K. V.; LAI, M. M. C. Coronaviridae: the viruses and their replication In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 1075-1093.

ISMAIL, M. M.; CHO, K. O.; WARD, L. A.; SAIF, L. J.; SAIF, Y. M. Experimental bovine coronavirus in turkey poult and young chickens. *Avian Diseases*. v. 45, n. 1. p. 157 – 163. 2001

JACOBSE-GEELS, H.; DAHA, M. R.; HORZIJEK, N. Isolation and characterization of feline C3 and evidence for the immune complex pathogenesis of feline infectious peritonitis. **Journal of Immunology**. v. 125, p. 1606-1610, 1980.

KAPIKIAN, A. Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel-Dekker Inc. 1994. 780 p.

KING, A. S.; MC LELLAND, J. **Birds: Their structure and function**. London: Baillière Tindall.. 1984. p. 229 – 284.

KING, B.; POTTS, B. J.; BRIAN, D. A. Bovine coronavirus hemagglutinin protein. **Virus Research**, v. 2, p. 53-59, 1985.

KLAUSEGGER, A.; STROBL, B.; REGL, G.; KASER, A.; LUYTJES, W.; VLASAK, R. Identification of a coronavirus hemagglutinin-esterase with a substrate specificity different from those of influenza C virus and bovine coronavirus. **Journal of Virology**, v. 73, n. 5, p. 3737-3743, 1999.

KREMPL, C.; SCHULTZ, B.; LAUDE, H.; HERRLER, G. Point mutations in the S protein connect the sialic acid binding activity with the enteropathogenicity of transmissible gastroenteritis coronavirus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 4, p. 3285-3287, 1997.

KUBO, H.; YAMADA, Y. K.; TAGUCHI, F. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein. **Journal of Virology**, v. 68, p. 5403-5410, 1994.

LAI, M. C. M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 1-100, 1997.

LI, W. **Molecular Evolution**. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 1997. 487 p.

LISTER, S. A.; BEER, J. V.; GOUGH, R. E.; HOLMES, R. G.; JONES, J. M. W.; ORTON, R. G. Outbreaks of nephritis in pheasants (*Phasianus colchicus*) with a possible coronavirus aetiology. **Veterinary Record**, v. 117, p. 612-613, 1985.

LUYTJES, W.; BREDENBEEK, P. J.; NOTEN, A. F. H.; HORZINEK, M. C.; SPAAN, W. J. M. Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA 2: indications for RNA-recombination between coronavirus and influenza C virus. **Virology**, v. 166, p. 415-422, 1988.

MÄKELÄ, M. J.; PUHAKKA, T.; RUUSKANEN, O.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; KIMPIMÄKI, M.; BLOMQVIST, S.; HYYPIÄ, T.; ARSTILA, P. Viruses and bacteria in the etiology of the common cold. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36 p. 539-542, 1998.

MALET, I.; BELNARD, M.; AGUT, H.; CAHOUR, A. From RNA to quasispecies: a DNA polymerase with proof reading activity recommended for accurate assessment of viral diversity. **Journal of Virological Methods**, v. 109, p. 161-170, 2003.

MCMANUS, J. F A.; MOWRY, R. W. **Staining methods**:histologic and histochemical. Hoeber Medical Division Harper & Row Publishers. 3. ed. 1965. p. 423.

MCNULTY, M. S.; BRYSON, D. G.; ALAN, G. M.; LOGAN, E. F. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. **Veterinary Microbiology**, v. 9, p. 425-434, 1984.

MÖSTL, K. Coronaviridae, pathogenic and clinical aspects: an update. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 13, p. 169-180, 1990.

NUTTAL, P. A.; HARRAP, K. A. Isolation of a coronavirus during studies on puffinosis, a disease of the Manx shearwater (*Puffinus puffinus*). **Archives of Virology**, v. 73, p. 1-13, 1982.

OSTROFF, S. Emerging infectious diseases 1997-1998: The role of molecular epidemiology. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 9, p. 1-3, 1999.

PAGE, R. D. M.; HOLMES, E. C. **Molecular Evolution**. A phylogenetic approach. Oxford: Blackwell Science, 1998. 345 p.

PATON, D.; IBATA, G.; SANDS, J.; MCGOLDRICK, A. Detection of transmissible gastroenteritis virus by RT-PCR and differentiation from porcine respiratory coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 66, p. 303-309, 1997.

PENNYCOTT, T. W. Causes of mortality and culling in adult pheasants. **Veterinary Record**, v. 146, p. 273 – 278, 2000.

PFLEIDERER, M.; ROUTLEDGE, E.; SIDELL, S. G. Functional analysis of the coronavirus MHV-JHM surface glycoproteins in vaccinia virus recombinants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 276, p. 21-31, 1990.

POMEROY, B. S.; NAGARAJA, K. V. Coronaviral enteritis of turkeys (bluecomb disease). In: CALNEK, B.W., BARNES, J., BEARD, C.W., REID, W.M., YODER, H.W. **Diseases of Poultry** 9th ed. Ames: Iowa State University Press,. 1991.

RASOOL, N. B. G.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I. Determination of a universal nucleic acid extraction procedure for PCR detection of gastroenteritis viruses in faecal specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 100, p. 1-16, 2002.

REST, J.; MINDELL, D. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 3, p. 219-225, 2003.

RETTIG, P. J.; ALTSHULER, G. P. Fatal gastroenteritis associated with coronaviruslike particles. **American Journal of Diseases of Children**, v. 139, p. 245-248, 1985.

RISCO, C.; ANTON, I. M.; ENJUANES, L.; CARRASCOSA, J. L. The transmissible gastroenteritis coronavirus contains a spherical core shell consisting of M and N proteins. **Journal of Virology**, v. 70, n. 7, p. 4773-4777, 1996.

RIZZO E.; TUCHIYA, H.; MARTINEZ, C. H. Técnicas **básicas de cultura celular**. São Paulo: Instituto Butantan. Instituto Adolfo Lutz, 1983.

SCHALK, A. F.; HAWN, M. C.; DAK, F. N. An apparently new respiratory disease of baby chicks. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 78, p. 413-423, 1931.

SCHULTZE, B.; GROSS, H. J.; BROSSMER, R.; HERRLER, G. The S protein of bovine coronavirus is a hemagglutinin recognizing 9-O-acetylated sialic acid as a receptor determinant. **Journal of Virology**, v. 65, p. 6232-6237, 1991.

SNIJDER, E. J.; SPAAN, W. J. M. The coronavirus superfamily. In: SIDDELL, S. G. **The coronaviridae**. New York: Plenum, 1995.

SPACKMAN, D.; CAMERON, I. R. D. Isolation of infectious bronchitis virus from pheasants. **Veterinary Record**, v. 113, p. 354-355, 1983

STEPHENSEN, C. B.; CASEBOLT, D. B.; GANGOPADHYAY, N. N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. **Virus Research**, v. 60, p. 181-189, 1999.

TAGUCHI, F. Fusion formation by the uncleaved spike protein of murine coronavirus JHMV variant c1-2. **Journal of Virology**, v. 67, p. 1195-1202, 1993.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANIHOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. In: REPORT OF THE INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES, 7., 2000. San Diego. **Proceedings**. San Diego: Academic Press, 2000. 1167 p.

VAUGHN, E. M.; HALBUR, P. G.; PAUL, P. S. Sequence comparison of porcine respiratory coronavirus isolates reveals heterogeneity in the S, 3, and 3-1 genes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 5, p. 3176-3184, 1995.

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, p. 2020 – 2028, 1996.

WINIARCZYK, S.; PAUL, P. S.; MUMMIDI, S.; PANEK, R.; GRADZKI, Z. Survey of porcine rotavirus G and P genotype in Poland and the United States using RT-PCR. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 49, p. 373-378, 2002.

WU, H.; GUY, J.; YOO, D.; VLASAK, R.; URBACH, E.; BRIAN, D. Common RNA replication signals exist among group 2 coronaviruses: evidence for in vivo recombination between animal and human molecules. **Virology**, In press 2003.

YOO, D.; PEI, Y.; CHRISTIE, N.; COOPER, M. Primary structure of the Sialodacryoadenitis virus genome: sequence of the structural-protein region and its application for differential diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 4, p. 568-573, 2000.

YOO, D. W.; PARKER, M. D.; BABIUK, L. A. The S2 subunit of the spike glycoprotein of bovine coronavirus mediates membrane fusion in insect cells. **Virology**, v. 180, p. 395-399, 1991.

ZHANG, J.; LIAO, D.; PARDINAS, J.; CHEN, L.; ZHANG, X. Different applications of polymerases with and without proof reading activity in single-nucleotide polymorphism analysis. **Laboratory Investigation**, v. 83, n. 8, p. 1147, 2003.