SIBELE PINHEIRO DE SOUZA

**Epidemiologia molecular em um surto de disenteria de inverno em
bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo e descrição de
genótipos para o Coronavírus bovino (BCoV)**

São Paulo

2008

SIBELE PINHEIRO DE SOUZA

**Epidemiologia molecular em um surto de disenteria de inverno em
bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo e descrição de
genótipos para o Coronavírus bovino (BCoV)**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2008

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

ef
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
8/12/08

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2079
FMVZ

Souza, Sibeles Pinheiro de

Epidemiologia molecular em um surto de disenteria de inverno em bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo e descrição de genótipos para o Coronavírus bovino (BCoV) / Sibeles Pinheiro de Souza. – São Paulo : S. P. Souza, 2008.

71 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Coronavírus. 2. Bovinos. 3. Genealogia. 4. Epidemiologia. 5. Molecular I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Disenteria de inverno em bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo: Detecção e genealogia de amostras entéricas de coronavírus bovino (BCoV)", protocolado sob o nº 1125/2007, não utilizando animais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/08/07.

(We certify that the Research "Winter dysentery in adult dairy cattle in São Paulo State: Detection and genealogy of enteric strains of bovine coronavirus (BCoV)", protocol number 1125/2007, not utilizing animals, under the responsibility Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/22/2007.

São Paulo, 22 de agosto de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOUZA, S. P.

Título: Epidemiologia molecular em um surto de disenteria de inverno em bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo e descrição de genótipos para o Coronavírus bovino (BCoV)

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

*Aos meus queridos avôs Isaura Pinheiro Augusto (“**Lolinha**”) in memoriam e
José Augusto de Souza (“**Vovis**”).*

*Livros, testamentos
Folhas de jornal
A vida é curta, mas não é pouca*

*Máquina do tempo,
Bola de cristal
Sobrenatural é eu saber que não serei pra sempre assim
Me destaco de um álbum de fotografia antigo pra lembrar de mim*

*Dizem fiquei fora
por tempo demais
e aquele agora ou nunca ficou pra trás*

*O que não disseram
é que voltei diferente
e que o meu agora
é daqui pra frente*

*Nada me amarra
Passado é propulsão
Todos meus caminhos
Começam com um pé no chão
Hoje quando o sol saiu, eu resolvi voltar*

*Sobrenatural
Mauro Motoki*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Paulo Eduardo Brandão**, “Pai científico”, pela orientação, pela bela amizade e exemplo de cientista-professor, sempre entusiasmado com a ciência e perseverante quanto seus orientados.

Ao Prof. Dr. **Silvio Arruda Vasconcellos**, por toda dedicação à Pós-Graduação do VPS.

À Prof. Dra. **Maria Solange Gennari**, pelo empenho com a Pós-Graduação do VPS.

Ao Prof. Dr. **José Antonio Jerez**, “Avô científico”, pelo carinho, por suas valiosas sugestões e agradáveis conversas.

Ao Prof. Dr. **Ricardo Augusto Dias**, por nossa amizade instantânea desde a entrevista.

Ao Prof. Dr. **Fernando Ferreira**, pela paciência, por sempre tentar mostrar-me “a vida como ela é” e por toda a dedicação à nossa amizade.

Ao Prof. Dr. **José Soares Ferreira Neto**, sempre paciente em atentar-me sobre a importância sobre a correta identificação dos símios.

Ao Prof. Dr. **Nilson Roberti Benites**, por nossa amizade.

Ao Prof. Dr. **Rodrigo Martins Soares**, sempre empenhado em resolver os dilemas científicos.

Ao Prof. Dr. **Marcelo Bahia Labruna**, pelo exemplo de liderança e seu pacote de piadas.

Ao Prof. Dr. **Leonardo José Richtzenhain**, que em suas aulas sempre nos desperta para os valores da vida.

Ao Prof. Dr. **Marcos Amaku**, por suas belas aulas de estatística e conversas.

Ao Prof. Dr. **Arthur Gruber**, por nossa amizade, pelo exemplo de cientista e por seu empenho em tornar seus alunos acima da média.

Ao Prof. Dr. **Joseph Harari**, sempre gentil com seus alunos.

Ao Lorde Professor Dr. **Jeffrey Jon Shaw**, pessoa rara nos dias atuais.

Ao Prof. Dr. **Carlos José de Pereira da Cunha de Araujo Coutinho**, sempre um grande amigo e professor.

À fiel amiga **Tânia Delonero**, pelas risadas, por sua ajuda, competência e carinho.

Ao **Pedro César Ferreira da Silva**, “Pedrinho”, sempre tornando o dia mais firme na luta.

À **Sheila Oliveira de Souza Silva**, "Sheilita", pela eficiência e amizade.

À **Jucélia de Jesus Pereira**, "Jú", sempre atenciosa e amiga.

Ao **Alexandre Abelardo Sanches** e **Sandra Sanches**, pelas caronas, torcida e carinho.

Ao **Danival Lopes Moreira**, **Maria Cristina Paick** e **Ana Virginia Pacheco de Almeida Prado Chacur**, sempre empenhados em fazer com que as questões fossem resolvidas instantaneamente.

Às **funcionárias da biblioteca Biblioteca Virginie Buff D'Ápice**, por toda eficiência demonstrada ao longo dessa etapa.

Ao **Rafael de Novaes Oliveira**, "Rafito", amigo incondicional, independente de nossos hábitos.

À **Anaiá da Paixão Sevá**, "Naiá", piadista e grande amiga de roubadas, sempre presente nos momentos decisivos.

Ao **Maurício Claudio Horta**, "Má", belo pesquisador, amigo conselheiro, incentivador.

À **Vanessa Riesz Salgado**, "VanVan", grande amiga do peito, desde minha procuradora, à foliã mais alegre.

Ao **Willian de Oliveira Fahl**, "Villian", por ser um grande amigo de todas as horas.

À **Thaís Lucas Sandri**, "musa do verão", por nossa amizade, por seus cuidados comigo e por agüentar minhas maluquices.

À **Estela Gallucci Lopes**, "Estelinha", sempre disposta a fazer seu melhor em prol de seus amigos, com suas imitações engraçadas e carinho extremo.

Ao **Carlos Alberto Geraldo Junior**, "Paquito", que sempre sabia quais eram meus dias luzes-apagadas, pela amizade e carinho.

À **Rosely Bianca dos Santos Kuroda**, "Bibs", sempre amiga eficiente e carinhosa nos momentos críticos.

À **Karen Miyuki Asano**, "Xuxu", amiga de todos os momentos, por sua eficiência e risadas engraçadas.

Ao **José Henrique de Hildebrand e Grisi Filho**, "Zé", por todo apoio.

À **Maria Halina Ogrzewalska**, grande conselheira, pelo carinho.

Ao **Richard Pacheco**, amigo-colaborador, sempre pronto-atendimento as necessidades do meu projeto.

À **Giselle Ayres Razera**, "Giselaum", por suas reconfortantes palavras nos momentos decisivos.

Ao **Renato A. Ogata**, "Renatíssimo", ótimo interprete do boneco de Olinda, amigo de todas as horas.

À **Iracema Nunes de Barros**, "Amiga imaginária", por toda ajuda, ótima amiga, mesmo que não saiba fazer a garrafada "*Crazy Prince*".

À Dra. **Laura Yaneth Buitrago Villarreal**, "Laurita's", amiga-professora, por todos os nossos momentos de risadas e por acreditar em meu potencial.

À **Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro, Adriana Cortez, Lara Borges Keid, Enio Mori**, por todas as sugestões e amizade.

À **Paula Beatriz Munhoz Soares**, "Paulabia", grande amiga, por sempre visualizar meus *feelings*.

Ao **Fábio Gregori**, "Referência Bibliográfica", sempre muito prestativo e simpático.

Aos amigos do Instituto Pasteur, **Juliana Galera Castilho e Pedro Carnieli Junior**, eficientes e divertidos.

À **Carina Nishio**, "Carininha", por todos os conselhos e amizade.

Ao **Jonas de Moraes filho**, "menino maluquinho", sempre alegrando os corredores, bom amigo-ouvinte.

Ao **André Becker Simões Saidenberg**, "Thomas", sério pesquisador, sempre pontual em nossos chás.

Ao **Nilton Fidalgo Peres, Marianna Matronne, Mikaela Renata Funada, Patrícia de Oliveira Esmerini e Carlos Augusto Scacchetti de Almeida**, pela amizade e consideração ao longo desses anos.

À **Ekaterina A. Durymanova Ono** "Kátia", **Marcio Pinotti Guirao** "Marciaum" e **Aline Santana da Hora** "Linauns", sempre atenciosos.

À **Mara Cristina Peruzetto e Patrícia de Lucca**, "futuras pesquisadoras", pelo carinho.

Aos **Pós-Graduandos** que trabalham no VPS.

À **Aline Gil Alves Guilloux**, "Line" acolhedora e paciente.

Ao **Leandro de Oliveira Gonzaga, Monalysssa Camandaroba e Juliana Cupolillo Coelho**, amigos especiais.

Ao **Lucas de Souza Gonçalves**, “Smirilim”, meu amado afilhado, por sempre abraçar-me quando estou triste.

Ao meu pai **Edivaldo José Pinheiro de Souza**, sempre com suas belas palavras em meus momentos de incertezas.

À **Tálytta Gouveia Pinheiro de Souza** e **Aline Gouveia Pinheiro de Souza**, minhas queridas irmãs, por todo amor.

Ao **Fernando Pinheiro de Souza Ricca** e **Flávio Pinheiro de Souza Ricca**, primos-irmãos, por todo empenho e carinho.

À **Márcia Maria Pinheiro de Souza Gonçalves** ”Tia” e ao **Luiz Carlos Pinheiro de Souza** “John Locke”, meus tios-pais, pela dedicação e carinho em todos os momentos de minha vida.

À **Cristina Gouveia Pinheiro de Souza**, “Cris”, por nossas risadas e por sempre fazer o seu melhor para me ajudar.

A toda minha Grande Família, “**Pinheiro de Souza, Gonçalves e Ricca**” onde cada um com seus valores ajudaram-me a ser quem sou.

À **Juliana Levino Pereira** e “Nossa” linda Família, por todo carinho e amizade ao longo desses muitos e muitos anos.

Ao **Freddy Castelano Zanella**, “Querido Fef”, que chegou trazendo alegria e amor à minha vida.

Ao **Rodrigo Gomes Barbosa** e sua Família, por toda dedicação e afeto.

Ao **Danny Castelano Zanella**, “Dan do Amaral” e suas acolhedoras famílias “**Castelano’s**” e “**Zanellas’s**”, por todo o carinho.

Aos amigos da **Lemon Party**”, por todas as festas e torcida para o meu sucesso.

Ao **José Roberto da Silva**, ”Zé”, por nunca medir esforços para ajudar-me.

A **CAPES** (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

RESUMO

SOUZA, S. P. **Epidemiologia molecular em um surto de disenteria de inverno em bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo e descrição de genótipos para o Coronavírus bovino (BCoV).** [Molecular epidemiology in an outbreak of winter dysentery in adult dairy cattle in the state of São Paulo and description of genotypes for Bovine coronavirus (BCoV)]. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O coronavírus bovino (BCoV) é classificado no Grupo 2 do gênero *Coronavirus* da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, causando disenteria (disenteria de inverno) em bovinos adultos, diarreia em bezerros neonatos e processos respiratórios em bovinos adultos e jovens. No presente estudo, 21 amostras fecais de vacas leiteiras colhidas durante um surto de disenteria em uma propriedade de Paranapanema no Estado de São Paulo positivas para BCoV foram submetidas a reações de PCR para amplificação parcial dos genes codificadores das proteínas S (448pb) e HE (441pb) do BCoV. Destas amostras, 14 foram positivas para cada PCR (não simultaneamente), sendo os fragmentos amplificados submetidos a seqüenciamento de DNA para reconstrução genealógica por máxima parcimônia através de algoritmo heurístico em conjunto com seqüências homólogas recuperadas do GenBank. Considerando-se o gene S, a identidade de nucleotídeos entre as 14 amostras aqui estudadas foi de 100%, tendo as mesmas segregado em um grupo exclusivo; além disso, demais amostras brasileiras incluídas no estudo segregam em outros dois grupos. Em relação ao gene HE, as 14 amostras estudadas apresentaram identidade de nucleotídeos de 100%, mas a árvore genealógica apresentou topologia pouco resolvida, tendo estas amostras, segregado em grupo politômico com as seqüências homólogas incluídas. Comparações entre os diversos grupos nas árvores do gene S em termos de aminoácidos revelaram marcadores grupo-específicos, com substituições exclusivas para as amostras de BCoV aqui estudadas. Com base nestes resultados, conclui-se que, durante o transcorrer do surto de disenteria de inverno, uma única linhagem de BCoV estava presente, baseado no seqüenciamento parcial dos genes S e HE e que há pelo menos três genótipos de BCoV presentes no Brasil em relação ao gene S e ao menos um em relação ao gene HE, considerando-se as regiões gênicas e as seqüências incluídas no presente estudo.

Palavras-chave: Coronavírus. Bovinos. Genealogia. Epidemiologia. Molecular.

ABSTRACT

SOUZA, S. P. **Molecular epidemiology in an outbreak of winter dysentery in adult dairy cattle in the state of São Paulo and description of genotypes for Bovine coronavirus (BCoV)** [Epidemiologia molecular em um surto de disenteria de inverno em bovinos leiteiros adultos no Estado de São Paulo e descrição de genótipos para o Coronavírus bovino (BCoV)]. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Bovine coronavirus (BCoV) is classified in group 2 of the genus *Coronavirus*, family *Coronaviridae*, order *Nidovirales*, and causes winter dysentery in adult bovine, neonatal calf diarrhea, and respiratory disorders in both adult and young bovine. In this investigation, 21 fecal samples from dairy cows collected during an outbreak of dysentery in a farm located at Paranapanema, São Paulo State, all positive to BCoV, were submitted to PCRs to partial amplification of genes S (448bp) and HE (441bp) of BCoV. Fourteen out of these samples were positive for each PCR (not simultaneously) and the amplicons were submitted to DNA sequencing for genealogic reconstruction with maximum parsimony and heuristic algorithm with homologous sequences retrieved from the GenBank. Regarding *S* gene, the nucleotide identity among the 14 strains was 100% and these segregated in an exclusive cluster; furthermore, the other Brazilian strains included in the analysis segregated in other two clusters. Taking into account the *HE* gene, the 14 strains analyzed presented a nucleotide identity of 100%, but the genealogic tree showed a low-resolved topology, having these samples segregated in a polytomic cluster with the homologous sequences included. Amino acid comparisons among the different clusters in the trees of gene *S* revealed cluster-specific markers, with exclusive substitutions for the BCoV strains studied herein. Based on these results, one can conclude that, during the winter dysentery outbreak, a single BCoV lineage was involved based on partial *S* and *HE* genes sequences and that there are at least three genotypes of BCoV in Brazil regarding *S* gene and at least one regarding *HE* gene, taking into account the gene regions and the sequences included in this investigation.

Key-words: Coronavirus. Bovine. Genealogy. Epidemiology. Molecular.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Min	minuto de hora
%	porcento
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
BCoV	coronavírus bovino
BVD	diarréia viral bovina
°C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DEPC	dietil-pirocarbonato
et al.	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
g	aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
HE	hemaglutinina esterase
HmLu-1	hamster lung cell line
IBR	rinotraqueite infecciosa bovina
kDa	quiloDalton
M	Molar
mM	milimolar
ng	nanogramas
mL	mililitro
µg	micrograma
µL	microlitro
MHV	murine hepatitis virus
ORF	open reading frame
Pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pmol	picomoles
RNA	ácido nucléico
RT	transcrição reversa
S	espícula
U	unidade internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1	AMOSTRAS CLÍNICAS.....	24
3.2	AMOSTRA VIRAL DE REFERÊNCIA	26
3.3	PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE RNA	26
3.4	PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE HEMI-NESTED (HEMI-NESTED RT-PCR) PARA O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA-ESTERASE (HE) DO CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV)	26
3.4.1	Desenho de primers	27
3.4.2	Determinação da temperatura ótima de hibridação	27
3.4.3	Limiar de detecção (sensibilidade analítica)	28
3.4.4	Aplicação da hemi-nested RT-PCR às amostras clínicas.....	29
3.5	APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV	29
3.6	SEQÜENCIAMENTO DE DNA	30
3.7	EDIÇÃO DE SEQÜÊNCIAS.....	31
3.8	ANÁLISE GENEALÓGICA E DE DIVERSIDADE MOLECULAR.....	32
4	RESULTADOS.....	37
4.1	PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE HEMI-NESTED (HEMI-NESTED RT-PCR) PARA O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA-ESTERASE (HE) DO CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV)	37
4.1.1	Desenho de primers e determinação da temperatura ótima de hibridação	37
4.1.2	Limiar de detecção (sensibilidade analítica)	37
4.1.3	Aplicação da hemi-nested RT-PCR às amostras clínicas.....	38
4.2	APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV	39
4.3	SEQÜENCIAMENTO DE DNA	41
4.4	ANÁLISE GENEALÓGICA	42
4.5	ANÁLISE DE DIVERSIDADE MOLECULAR.....	45
4.5.1	Gene S.....	45

4.5.2	Gene <i>HE</i>	48
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	64

INTRODUÇÃO

Paradigma sobre o Pellet:

*“Muitos viram e creram, mas bem-aventurados são os que nunca viram e crêem
mesmo assim”.*

Paulo Eduardo Brandão

1 INTRODUÇÃO

Em 2007, a produção total de leite no Brasil foi de 26,4 bilhões de litros, sendo a atividade leiteira importante para o cenário econômico e social do país, visto que tal atividade gera empregos permanentes, esse setor envolve cerca de cinco milhões de pessoas e 1,3 milhões de produtores de leite. A região Sudeste concentra a maior produção com cerca de 10.005 milhões de litros de leite para o mesmo ano, gerando uma participação de 38% na produção total do país (EMBRAPA, 2008). Esta produção levou a uma exportação de leite e derivados em um valor total de US\$ 298.97 milhões no ano de 2007 (ZOCCAL; CARNEIRO, 2008).

Estes indicadores deixam claro que a atividade leiteira ainda pode constituir importante fonte de divisas internas e externas para o Brasil, mas, para tanto, depende absolutamente da sanidade do rebanho, controlando processos patológicos que possam diminuir a produção de leite e desacelerar o crescimento do setor.

Dentre tais processos, destaca-se a disenteria de inverno, uma doença infecto-contagiosa aguda de ocorrência epizootica com tendência sazonal e distribuição mundial, que acomete bovinos adultos, com maior prevalência na população de bovinos leiteiros, causada pelo coronavírus bovino (BCoV), com casos de associação com *Salmonella* sp, rotavírus, IBDV, *Cryptosporidium parvum* e *Eimeria bovis* (DURHAM et al., 1989; PARK et al., 2006; BRANDÃO et al., 2007).

A primeira descrição da doença como hoje é conhecida foi feita por Horner et al. (1975). Desde então, a disenteria de inverno foi relatada na Austrália, Suécia, Inglaterra, Israel, França, Bélgica e Japão (CAMPBELL; COOKINGHAM, 1978). Em 2004, surtos foram relatados também em bovinos leiteiros em Cuba (BARRERA et al., 2006).

No Brasil, o primeiro caso da doença ocorreu em 2002, envolvendo um surto em bovinos leiteiros no Estado de São Paulo em 2001 (BRANDÃO et al., 2002). A partir desta data, foram descritos surtos nos Estados de São Paulo (MONTELEONE et al., 2002) e Minas Gerais (TAKIUCHI et al., 2008).

Os surtos anuais, que podem ter duração máxima de 10 dias, iniciam-se pela manifestação dos sintomas durante os meses de inverno em um pequeno número de animais no primeiro dia, mas a taxa de ataque é tal que em cerca de três dias 100% das vacas em lactação podem apresentar sintomas. Os animais acometidos, a despeito da baixa mortalidade observada,

apresentam disenteria aguda severa, podendo ser hemorrágica, com intensa excreção de tecido entérico, perda de condição corporal, desidratação e agalactia severa que pode levar a uma queda de até 90% na produção de leite (BRANDÃO et al., 2002; MONTELEONE et al., 2002).

O coronavírus bovino, agente etiológico da disenteria de inverno, é um coronavírus pertencente ao Grupo 2, classificado na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, a qual compreende os gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*. Na mesma ordem, encontram-se também as famílias *Arteriviridae* e *Roniviridae* (HOLMES; LAI, 1996; VAN REGENMORTEL et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2003).

Os coronavírus são vírus envelopados pleomórficos aproximadamente arredondados com até 220nm de diâmetro, com cinco ou seis proteínas estruturais (N, M, sM, HE, S e I), dependendo da espécie viral. O genoma é constituído por um RNA de fita simples não-segmentado de sentido positivo com até 32 kb, que o torna o mais longo de todos os vírus RNA conhecidos, originando um nucleocapsídeo de simetria helicoidal em associação com a nucleoproteína N, uma fosfoproteína de 50-60kDa rica em aminoácidos básicos (HOLMES; LAI, 1996; LAI; CAVANAGH, 1997).

Todos os coronavírus possuem estrutura genômica semelhante, que podem estar organizadas em 7 a 13 janelas de leitura aberta (ORF) de acordo com seu respectivo grupo antigênico (LIU et al., 2006). O envelope viral é formado por uma camada dupla de lipídios com cinco proteínas estruturais (M, sM, HE, S e I) dela se projetando, resultando no aspecto de uma coroa (do latim *corona*). Há alguns anos, um *core* esférico foi encontrado em crioelctromicroscopia no vírus da gastroenterite transmissível dos suínos, *core* este constituído pela proteína N associada à proteína M ou uma subclasse desta (RISCO et al., 1996).

Como característica exclusiva de grupo, os coronavírus do grupo 2 apresentam uma proteína de envelope denominada de hemaglutinina-esterase (HE), com cerca de 65 kDa, encontrada sob a forma de dímeros (KING et al., 1985). Apesar de sua denominação, a HE tem uma atividade hemaglutinante fraca quando comparada à da proteína S (SCHULTZE et al., 1991; FUKUTOMI et al., 1999) e contém uma enzima destruidora de receptores (esterase) que cliva resíduos 9-O-acetil de ácidos siálicos (CLARK, 1993; KOURTESIS, GÉLINAS; DEA 2001).

Interessantemente, a proteína HE dos coronavírus guarda similaridade com a HE dos vírus influenza C, o que indica uma possível recombinação entre estes dois vírus (LUYTJES et al.,

1988), apesar de alguns coronavírus do grupo 2 apresentem uma especificidade por substratos diferentes quando comparados aos vírus influenza C e ao BCoV (KLAUSEGGER et al., 1999).

A principal proteína estrutural de envelope dos coronavírus é a proteína S (“spike“, espícula), antigamente nomeada de E2. Esta forma projeções de cerca de 20nm de comprimento responsáveis pela aparência espiculada do vírion e pela atividade hemaglutinante e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes, seguida pela proteína HE; ambas podem estar envolvidas no tropismo pelo tecido do hospedeiro (COLLINS et al., 1982; GÉLINAS et al., 2001).

É também a proteína mais polimórfica entre os coronavírus, organizada como dímeros ou trímeros. A proteína completa tem 180 kDa, mas, em algumas espécies virais, como o BCoV, é clivável nas subunidades S1 e S2, com cerca de 90 kDa cada (CAVANAGH, 1995).

A subunidade carboxi-terminal S2 forma a haste da espícula, responsável pela fusão de membranas e formação de sincícios; em função de não apresentar domínios hidrofóbicos, esta atividade fusogênica pode ser devida a alterações conformacionais causadas pela subunidade S1 (LAI; CAVANAGH, 1997). O peptídeo de fusão da S2 é sugerido como sendo PEP1, localizado na mais longa das repetições heptádicas da estrutura da mesma (LUO; WEISS, 1998). A clivagem proteolítica da proteína S pode ser um passo necessário à formação de sincícios, mas esta é ainda uma hipótese controversa (TOTH, 1982; CYR-COATS; STORZ, 1988; HONDA et al., 1990). No coronavírus MHV, substituições de aminoácidos no códon de iniciação e no grupo de aminoácidos básicos do sítio de clivagem levam à perda da capacidade de clivagem e de formação de sincícios (YAMADA et al., 1997). A subunidade S2 não é envolvida na ligação ao receptor celular (TAGUCHI; YAMADA; TAGUCHI, 1995).

A subunidade S1, ectodomínio aminoterminal da proteína S, muito mais variável do que a subunidade S2, apresenta atividade de ligação a receptores celulares e forma o bulbo da espícula dos coronavírus (LAI; CAVANAGH, 1997). No MHV, o sítio de ligação ao receptor localiza-se no domínio amino-terminal de S1, composto de 330 aminoácidos (KUBO et al., 1994), sendo os aminoácidos 33 a 40 os diretamente envolvidos na atividade de ligação a receptores (SAEKI et al., 1997). Por formar a porção bulbar da proteína S, que contém a maior parte dos sítios antigênicos, a subunidade S1 e o segmento do genoma dos coronavírus que a codifica são mais expostos a pressões seletivas imunológicas e, assim, mais propensos ao encontro de polimorfismos do que os demais genes e proteínas dos coronavírus (ABRAHAM et al., 1990).

O coronavírus bovino (BCoV) replica-se nos vilos das células absortivas do intestino delgado e em células não diferenciadas encontradas nas criptas do cólon, resultando em descamação, encurtamento dos vilos e diarreia mal-absortiva (PENSAERT et al., 1994). Além da disenteria de inverno observada em bovinos adultos, o BCoV causa diarreia neonatal em bovinos e ainda processos patológicos do trato respiratório superior em bezerros por volta dos 3 meses de idade, o que levou à hipótese de que uma infecção respiratória pudesse desencadear enterites por ingestão do vírus (MCNULTY et al., 1984; HECKERT et al., 1990; HECKERT et al., 1991; TSUNEMITSU et al., 1991). Infecções respiratórias podem também ocasionar broncopneumonia em bovinos (TEGTMEIER et al., 1999).

Pelo exposto, fica evidente que a disenteria de inverno, apesar de conhecida há décadas no hemisfério Norte, é ainda uma doença infecciosa que apenas começou a ser estudada entre o rebanho leiteiro brasileiro, mas que é responsável anualmente por períodos de quedas vertiginosas na produtividade do mesmo. Fica claro, também, que há um completo desconhecimento acerca das características genéticas e antigênicas dos coronavírus bovinos de vacas adultas circulantes em nosso meio e da relação destes com o coronavírus bovino classicamente associado à diarreia neonatal.

Assim sendo, a geração de dados acerca da disenteria de inverno em vacas no Brasil é um passo primordial para que se iniciem avanços dentro deste tema, uma vez que permite que sejam delineadas medidas profiláticas baseadas tanto na etiologia quanto na cadeia de transmissão, como, por exemplo, imunoprofilaxia e medidas inespecíficas de manejo e aprimoramento de condições sanitárias da pecuária leiteira.

OBJETIVOS

“Procuramos a iluminação pelo trabalho e pelo estudo”.

Paulo Eduardo Brandão

2 OBJETIVOS

Em vista do impacto econômico que a disenteria de inverno causa aos produtores de bovinos leiteiros, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- Padronizar uma reação de transcrição-reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase *hemi-nested* (*hemi-nested* RT-PCR) para o gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase (HE) do coronavírus bovino (BCoV).
- Estudar a diversidade molecular de amostras de BCoV detectadas durante um único surto de disenteria de inverno em uma propriedade leiteira com base em seqüências dos genes codificadores das proteínas de espícula S e hemaglutinina-esterase HE.
- Propor uma genealogia para as amostras brasileiras de BCoV com base em seqüências parciais dos genes codificadores das proteínas de espícula S e hemaglutinina-esterase HE em comparação com seqüências disponíveis em bancos de dados.

MATERIAL E MÉTODOS

“O importante não é o caminho, é ter duas pernas para andar”.

Paulo Eduardo Brandão

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram utilizadas neste estudo 21 amostras fecais (Quadro 1) colhidas diretamente do reto de vacas lactantes de raça holandesa branca e preta, durante um surto de disenteria ocorrido no mês de julho de 2003, em uma propriedade leiteira localizada no município de Paranapanema, no Estado de São Paulo, com 190 vacas em lactação, das quais 80% apresentavam sinais agudos como disenteria sanguinolenta e queda na produção de leite no momento da colheita.

Dos animais amostrados, 18 eram sintomáticos (idades variando de dois anos e dois meses a cinco anos e dois meses) e três assintomáticos, com idades variando de cinco anos e meio a seis anos e meio.

O rebanho encontrava-se vacinado contra IBR, BVD e leptospirose e, durante o andamento do surto, não houve relatos de diarreia neonatal bovina.

Todas as amostras utilizadas foram previamente estudadas quanto à presença de coronavírus bovino e outros agentes etiológicos de disenteria de inverno (BRANDÃO et al., 2007), estando descritas no quadro 1, tendo sido mantidas a -80 °C no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP até o momento de sua utilização para o presente estudo.

Amostra	Disenteria	BCoV	Rotavírus	Análise Bacteriológica	Análise Parasitológica
96	P	P	P	<i>Yersinia intermedia</i>	N
299	A	P	A	<i>Escherichia coli</i>	N
387	A	P	A	<i>Y. intermedia/ E. coli</i>	N
587	P	P	A	<i>Providencia rustigianii</i>	N
841	P	P	A	<i>Proteus penneri/ Klebsiella terrigena</i>	<i>Eimeria</i> sp
850	P	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	N
868	P	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	<i>Strongyloidea</i>
887	P	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	N
923	P	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	N
933	P	P	A	<i>Enterobacter agglomerans</i>	N
934	P	P	A	N	N
938	P	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	<i>Strongyloidea</i>
972	P	P	A	<i>Y. intermédia/ E. agglomerans</i>	N
978	P	P	P	N	N
1005	A	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	N
1174	P	P	A	<i>E. agglomerans</i>	N
1275	P	P	A	<i>P. rustigiani</i>	<i>Eimeria</i> sp
9146	P	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	N
9215	P	P	A	<i>E. agglomerans</i>	N
9219	P	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	N
9224	P	P	A	<i>E. coli</i> apatogênica	N

A = Ausente P = Presente N = Negativo

Quadro 1 – Amostras fecais de vacas utilizadas para a pesquisa de diversidade molecular de coronavírus bovino (BCoV) e ocorrência de agentes etiológicos implicados na disenteria de inverno. (Adaptado de BRANDÃO et al. 2007) - São Paulo, 2008

3.2 AMOSTRA VIRAL DE REFERÊNCIA

Como amostra de referência de coronavírus bovino, foi utilizada a amostra Kakegawa (AKASHI et al., 1980), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Takeo Sakai da Nihon University, Japão, previamente produzida em cultura de células da linhagem HmLu-1 (pulmão de hamster) em monocamadas em sistema rotativo, com o título hemaglutinante de 256.

3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE RNA

As amostras fecais foram preparadas como suspensões a 20% em água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil-piropicronato (água DEPC), mantidas a 4°C durante 30 min com agitações em vórtex a cada 10 min e, a seguir, clarificadas a 12.000 x g/ 30 min a 4 °C, tomando-se o sobrenadante como amostra. A extração do RNA total das suspensões fecais, da amostra viral de referência e do controle negativo (água DEPC) foi realizada com TRIzol Reagent (Invitrogen®), segundo as instruções do fabricante.

3.4 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE HEMI-NESTED (HEMI-NESTED RT-PCR) PARA O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA-ESTERASE (HE) DO CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV)

As amostras foram submetidas a uma *hemi-nested* RT dirigida à amplificação de um segmento de 441 pares de bases do gene codificador da proteína HE, utilizando-se a amostra Kakegawa como controle positivo e água DEPC como negativo, com o objetivo de produzir fragmentos para seqüenciamento de DNA para a reconstrução da genealogia das amostras deste estudo.

3.4.1 Desenho de primers

Os pares de primers externos foram aqueles descritos por Villarreal et al. (2004): primer senso CHES 5' TMT TTG GYG ACA GTC GTT C 3' e primer anti-senso CHEA 5' TTA TCM GAM TGC YTR GCA TT 3', com um produto esperado de 796 pares de bases (nt 122 a 917 do gene *HE* em relação à amostra Mebus de BCoV, número de acesso GenBank U00735).

Utilizando o algoritmo CLUSTAL/W no programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999), alinharam-se seqüências do gene *HE* de número de acesso GenBank S50936.1, U00735.2, AY184423.1, AY184422.1, AY184421.1, AY184420.1, AY184419.1, AY184418.1, AY184417.1, AY184416.1, AY184415.1, AY184414.1, AY184413.1, AY184412.1, AY184411.1, AY09770.1, AH010363.1, UO6093.2, L38963.2, M80842.1, AF058944.1, AF058943.1, AF58942.1, M84486.1 e M76372.1., utilizando-se a seqüência consenso para o desenho de um novo primer anti-senso, interno ao produto da primeira PCR, com o aplicativo Oligo Perfect™ Designer (Invitrogen™) no sítio <http://tools.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>, denominado de HE-NA (5' CCCCAAAATTAGCTTCACGA 3'), com um produto esperado de 441 pares de bases (nt 543 a 562) do gene *HE* em relação à amostra Mebus de BCoV, (número de acesso GenBank U00735).

O primer foi submetido ao BLASTn para a verificação da ocorrência de identidades não relacionadas ao gene *HE* de BCoV, o que poderia resultar em amplificações não-específicas.

3.4.2 Determinação da temperatura ótima de hibridação

Temperaturas ótimas de hibridação foram testadas para a combinação de primers a serem utilizados na hemi-nested RT-PCR (CHES e HE-NA) em gradiente de temperatura em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient com a amostra 96 e a amostra Kakegawa, elegendo-se como temperatura ótima para os primers aquela em que a reação mostrasse, após a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etideo a 0,5µg/mL, a banda do tamanho esperado de maior intensidade e com menor número de bandas inespecíficas.

A síntese de cDNA (transcrição reversa) foi realizada a 42°C por 60 min em um mix contendo 1 x *First Strand Buffer* (InvitrogenTM), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1μ μM de cada *primer* (CHES e HE-NA) e 200U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (InvitrogenTM), 7μL do RNA extraído, para um volume final de 20μL.

A amplificação foi realizada adicionando-se 5μL do produto de cDNA ao *mix* de PCR (1 x *PCR Buffer* (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada *primer* CHES e HE-NA, 1,5mM MgCl₂, 25,25 μL de água ultra-pura esterilizada e 1,25U de Platinum Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 50μL) submetidos a 25 ciclos de 94°C/1min, 53°C /1,5 min com gradiente de 5°C para 12 temperaturas diferentes (48°C, 48,2°C, 48,7°C, 49,6°C, 50,7°C, 52°C, 53,4°C, 56,1°C, 57,1°C, 58,8°C e 58,4°C) e 72°C/1min para extensão de DNA e finalizando, 72°C/10min para extensão final.

Dez microlitros do produto do *nested* foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5 % corados com brometo de etídeo 0,5 μg/mL e observados sob luz ultra-violeta.

3.4.3 Limiar de detecção (sensibilidade analítica)

O limiar de detecção para a *nested*- RT PCR os primers internos CHES e HE-NA foi encontrado testando-se a amostra BCoV Kakegawa diluída em base 10 até 10⁻⁶ utilizando-se como diluente uma suspensão a 20% de uma amostra fecal bovina previamente testada como negativa para BCoV por RT-PCR dirigida ao gene RdRp (BRANDÃO et al., 2005). Esta amostra foi testada também com os primers CHES e HE-NA com o intuito de se assegurar a negatividade da mesma.

À primeira amplificação (PCR), 5 μL de cada *c-DNA* foram adicionados ao *mix* de PCR (1 x *PCR Buffer* (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 μM de cada *primer* (CHES e CHEA), 1,5mM MgCl₂, 25,25 μL água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 50μL e submetidos a 35 ciclos de 94°C/ 1min, 53,4°C/1,5 min e 72°C/1 min, seguidos por 72°C/ 10 min para extensão final.

3.4.4 Aplicação da *hemi-nested* RT-PCR às amostras clínicas

Todas as 21 amostras descritas no quadro 2 e preparadas conforme o item 3.3 foram submetidas à extração de RNA, síntese de cDNA (transcrição-reversa), primeira amplificação (PCR) e segunda amplificação (*hemi-nested* PCR) como descrito no item 3.4, exceto que a temperatura de hibridação na fase *hemi-nested* foi aquela determinada como ótima.

Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada 3 amostras na reação de *nested* para o monitoramento de contaminações por DNA amplificado, também adicionado de mix e levado ao termociclador. Todas as reações foram feitas em salas separadas com intuito de evitar possíveis contaminações.

3.5 APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV

Todas as 21 amostras foram submetidas a uma *nested* RT-PCR dirigida à amplificação de um segmento de 488 pares de bases contendo a região hipervariável do segmento codificador da subunidade S1 da proteína S do coronavírus bovino, conforme protocolo descrito por Brandão et al. (2003), utilizando-se a amostra Kakegawa como controle positivo e água DEPC como negativo, para a produção de fragmentos a serem submetidos ao sequenciamento de DNA.

Os pares de primers externos (S1HS 5' CTATACCCAATGGTAGGA 3' e S1HA 5' CTGAAACACGACCGCTAT 3') produzem um fragmento 885pb (nt 1204 ao 2088 do gene S em relação à amostra Mebus de BCoV número de acesso GenBank U00735) e os internos (S1NS 5' GTTCTGTAGCAGGTTTAA 3' e S1NA 5' ATATTACACCTATCCCCTTG 3') produzem um fragmento de 448 pb (nt 1329 ao 1816 do gene S, interno ao produto da primeira PCR).

A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 min em um mix contendo 1 x *First Strand Buffer* (InvitrogenTM), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1 µM de cada *primer* (S1HS e

S1HA) e 200U de M-MLV *Reverse Transcriptase* (InvitrogenTM), com 7µL do RNA extraído, para um volume final de 20µL.

Após a obtenção do DNA complementar, foi realizada a reação de PCR pela adição de 5µL de cada *c-DNA* ao *mix* de PCR (1 x PCR *Buffer*TM (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* (S1HS e S1HA), 1,5mM MgCl₂, 25,25µL água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM) para um volume final de 50µL), submetidos a 35 ciclos de 94°C/1 min, 53,4°C /1,5 min e 72°C/1 min e 72°C/10 min para a extensão final.

A segunda amplificação foi realizada adicionando-se 5µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de PCR [1 x PCR *Buffer* (InvitrogenTM)], 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* S1NS e S1NA, 1,5mM MgCl₂, 25,25µL água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 50µL) submetidos a 25 ciclos de 94°C/1 min, 58,4°C /1,5 min e 72°C/1min para extensão de DNA e 72°C/10' para extensão final.

Cinco microlitros do produto do *nested* foram analisados em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e observados sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 488 pb.

Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada 3 amostras na reação de *nested* para o monitoramento de contaminações por DNA amplificado, também adicionado de *mix* e levado ao termociclador. Todas as reações foram feitas em salas separadas com o intuito de evitar possíveis contaminações.

3.6 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os fragmentos correspondentes aos genes *S* (488 pb) e *HE* (441 pb) obtidos conforme os itens 3.4 e 3.5 foram purificados dos géis de agarose com *GFXTM PCR DNA and GEL BAND Purification Kit* (GE Healthcare), quantificado visualmente com *Low Mass DNA Ladder* (InvitrogenTM) de acordo com as instruções do fabricante e submetidos ao sequenciamento bi-direcional de DNA em sequenciador automático ABI-377 (Applied BiosystemsTM).

A reação de seqüenciamento consistiu em 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Biosystems™), 4 µL de 5x *Sequencing buffer* (Applied Biosystems™), 4 pmol de cada primer senso e antisenso referentes a cada gene em reações separadas e 20 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/ 25min, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g por 5min e secando-se o precipitado a 95°C/5min, levando-se as amostras ao seqüenciador.

3.7 EDIÇÃO DE SEQUÊNCIAS

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antiseno de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo Phred online em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>¹ para avaliação da qualidade das bases dos mesmos, sendo utilizadas apenas as posições com escore maior do que 20, ou seja, menos de um erro a cada 100 bases seqüenciadas.

A seguir, os cromatogramas 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 final de cada amostra e gene foi obtida com o aplicativo Cap-Contig do programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida à BLASTn para confirmação do seqüenciamento em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>².

¹ Phred Aplicativo disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 2007/2008.

² BLAST Aplicativo disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 2007/2008.

3.8 ANÁLISE GENEALÓGICA E DE DIVERSIDADE MOLECULAR

As seqüências finais de cada gene para cada amostra foram alinhadas com seqüências homólogas dos genes *S* e *HE* de coronavírus bovino recuperadas do GenBank (Quadros 2 e 3), com o algoritmo CLUSTAL/W no programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999).

GENBANK	AMOSTRA	PAÍS
U06093S1	Quebec BCQ. 571	Canadá
U06091	Quebec BCQ. 9	Canadá
AF239306	Quebec BCQ. 7373	Canadá
AB277116	HOKKAIDO / 18 /05	Japão
AF058944	OK- 514-3	EUA
AY935638	KWD2	Coréia do Sul
AY935637	KWD1	Coréia do Sul
AF058943	LSU-94LSS-051-2	EUA
AY255831	USP1	Brasil
AB277120	Ishikawa / 1 / 99	Japão
AY935639	KWD3	Coréia do Sul
AY935646	KWD10	Coréia do Sul
DQ479424	Kakegawa	Brasil
AY606205	LYVB	Brasil
AY606204	USP14	Brasil
AY606203	USP13	Brasil
AY606202	USP12	Brasil
AY606201	USP11	Brasil
AY606200	USP10	Brasil
AY606199	USP9	Brasil
AY606198	USP8	Brasil
AY606197	USP7	Brasil
AY606196	USP6	Brasil
AY606195	USP5	Brasil
AY606194	USP4	Brasil
AY606193	USP3	Brasil
AY606192	USP2	Brasil
AY353075	WDBR-01	Brasil
DQ811784	DB2	EUA
AB277110	Hokkaido / 12 / 03	Japão

Continua

Quadro 2 – Seqüências do gene *S* de coronavírus bovino e bredavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia de coronavírus detectados em vacas adultas na cidade de Paranapanema no Estado de São Paulo segundo o número de acesso do GenBank, nomenclatura da amostra e país de origem - São Paulo, 2008

GENBANK	AMOSTRA	PAÍS
AB277107	Hokkaido / 9 / 03	Japão
AF239308	Ontário BCO. 43277	Canadá
DQ389659	KWD18	Coréia do Sul
AB277130	Tochigi / 2 / 01	Japão
AB277122	Ishikawa / 3 / 01	Japão
DQ389660	KWD19	Coréia do Sul
DQ389655	KWD14	Coréia do Sul
DQ389635	KCD4	Coréia do Sul
DQ389640	KCD9	Coréia do Sul
DQ479423	BR- UEL3	Brasil
DQ479422	BR- UEL2	Brasil
DQ479421	BR- UEL1	Brasil

Conclusão

Quadro 2 – Sequências do gene *S* de coronavírus bovino e bredavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia de coronavírus detectados em vacas adultas na cidade de Paranapanema no Estado de São Paulo segundo o número de acesso do GenBank, nomenclatura da amostra e país de origem - São Paulo, 2008

GENBANK	AMOSTRA	PAÍS
DQ479421	BR- UEL1	Brasil
EF424618	EAH65TC	EUA
EF424616	RAH65TC	EUA
AF339836	Quebec BCQ. 3994	Canadá
AF239309	Ontário BCI. 44175	Canadá
AF058942	LY – 138	EUA
EU814648	438 / 06 – TN – 50	Itália
EF445634	339 / 06	Itália
AY427798	Breda 1	Canadá
AJ575373	B145	Holanda
AB354579	Kakegawa	Japão
BCU00735	Mebus	EUA
AF220295	Quebec	Canadá
DQ811784	DB2	EUA
AF239306	Quebec BCQ. 7373	Canadá
AF058943	LSU – 94LSS-05-2	EUA
EF424619	E – AH 187	EUA
EF424616	E – AH65TC	EUA
EF424620	R – AH187	EUA

Continua

Quadro 3 – Sequências do gene *HE* de coronavírus bovino e do gene *HE* de influenza C recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia de coronavírus detectados em vacas adultas na cidade de Paranapanema no Estado de São Paulo segundo o número de acesso do GenBank, nomenclatura da amostra e país de origem - São Paulo, 2008

GENBANK	AMOSTRA	PAÍS
EF424615	E – AH 65	EUA
AF230524	BCQ . 2442	Canadá
AF230523	BCQ . 2508	Canadá
AF239309	BCO. 44175	Canadá
AF239308	Ontário BCQ . 43277	Canadá
AF339836	Quebec BCQ. 3994	Canadá
AF230527	Quebec BCQ.701	Canadá
AF230526	Quebec BCQ. 376	Canadá
DQ389651	KCD10	Coréia do Sul
DQ389649	KCD8	Coréia do Sul
DQ389645	KCD4	Coréia do Sul
DQ389644	KCD3	Coréia do Sul
DQ389642	KCD1	Coréia do Sul
AF239307	Quebec BCQ. 1523	Canadá
AF230528	Quebec BCQ.708	Canadá
AF058944	OK – 0514 - 3	EUA
EF445634	339 / 06	Itália
DQ994170	KWD19	Coréia do Sul
DQ994169	KWD18	Coréia do Sul
AM410041	Vírus da influenza C “C/ Johannesburg/1/66”	França
M17868	Vírus da influenza C	EUA

Conclusão

Quadro 3 – Sequências do gene *HE* de coronavírus bovino e do gene *HE* de influenza C recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia de coronavírus detectados em vacas adultas na cidade de Paranapanema no Estado de São Paulo segundo o número de acesso do GenBank, nomenclatura da amostra e país de origem - São Paulo, 2008

Os alinhamentos obtidos para cada gene foram utilizados para a geração das árvores com critério de otimização de máxima parcimônia, com algoritmo heurístico e 1000 repetições de bootstrap através do programa PAUP* 4.0B10 (SWOFFORD, 2000) com ambiente gráfico para Windows gerado pelo programa PaupUp (CALENDINI, 2005), considerando-se os *gaps* como um quinto estado de caracter e utilizando-se a árvore consenso estrito para as análises, enraizando as árvores com duas sequências homólogas de bredavírus bovino (AY427798 e AJ575373) e vírus da influenza C (M17868 e AM410041) como grupos externos para os genes *S* e *HE*, respectivamente.

As identidades entre as seqüências de nucleotídeos para cada um dos grupos de alinhamentos foram calculadas com o programa Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999) para todas as seqüências incluídas no estudo, calculando-se médias e desvios-padrão com o programa Microsoft® Office Excel 2003.

Para os cálculos de identidades de aminoácidos, foram excluídas seqüências de nucleotídeos com 100% de identidade entre si, bem como aquelas com 100% de identidades de aminoácidos quando realizada a tradução com Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999).

As seqüências restantes, então traduzidas para aminoácidos, foram alinhadas com o algoritmo CLUSTAL/W utilizando-se a matriz BLOSUM 62 com o Bioedit v. 5.0.9 (HALL, 1999) calculando-se médias e desvios-padrão com o programa Microsoft® Office Excel 2003.

RESULTADOS

“Sempre será cedo para aqueles que têm preguiça de despertar”.

Paulo Eduardo Brandão

4 RESULTADOS

Os resultados baseados nas metodologias definidas para esse trabalho estão descritos nos itens a seguir.

4.1 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO-REVERSA SEGUIDA DE REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE HEMI-*NESTED* (HEMI-*NESTED* RT-PCR) PARA O GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA-ESTERASE (HE) DO CORONAVÍRUS BOVINO (BCoV)

4.1.1 Desenho de primers e determinação da temperatura ótima de hibridação

O primer interno HE-NA não resultou em seqüências não homólogas de escore significativo ao gene *HE* de BCoV após a realização de BLAST/n.

Para o teste de gradiente de temperaturas de hibridação utilizando-se a amostra 96 como referência, a reação referente à temperatura de 53,4°C foi aquela para a qual se observou a banda esperada de 441pb com maior intensidade após eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL (Figura 1).

Para a amostra Kakegawa, não se observaram quaisquer bandas amplificadas em nenhuma das temperaturas de hibridação testadas.

4.1.2 Limiar de detecção (sensibilidade analítica)

A análise do limiar de detecção da hemi-*nested* dirigida ao gene *HE* utilizando a temperatura de hibridação de 53,4°C produziu resultados positivos em gel de agarose a 1,5%

corado com brometo de etídeo após a reação de *hemi-nested* RT-PCR (441 pb) até a diluição 10^{-6} da amostra Kakegawa e para a mesma amostra não diluída. Nas reações referentes à amostra fecal utilizada como diluente, ao controle negativo, bem como às alíquotas de água DEPC incluídas na fase de *nested*, não se observaram quaisquer bandas.

Fonte: SOUZA, S. P. (2008).

Figura 1 – Resultados do limiar de detecção da *hemi-nested* RT-PCR dirigida ao gene *HE* em gel de agarose 1,5% com a temperatura de hibridação de 53,4 °C utilizando-se a amostra Kakegawa nas diluições 10^0 (não diluída) a 10^{-6} utilizando como padrão *LADDER* = 100pb – São Paulo – 2008

4.1.3 Aplicação da *hemi-nested* RT-PCR às amostras clínicas

A reação de *hemi-nested* RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína HE foi aplicada a todas as 21 amostras fecais de vacas, resultando em 16 amostras positivas, de acordo com o aparecimento da banda de 441pb (Figura 2 e Quadro 4), como para amostra Kakegawa (controle positivo).

Os controles negativos adicionados a cada três amostras na fase de *hemi-nested* não apresentaram quaisquer bandas, bem como os controles negativos inseridos a partir da extração de RNA (água DEPC).

Fonte: SOUZA, S. P. (2008).

Figura 2 – Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo mostrando o fragmento esperado de 441pb nos resultados da *nested*-RT PCR dirigida ao gene codificador da proteína HE de BCoV, sendo 96, 587, 841, 850, 868, 887, 923, 934, 938, 1275, as amostras do presente estudo e CN1, o controle negativo (água DEPC) adicionado na fase da *nested* e C+ e C- os controles adicionados desde a extração – São Paulo – 2008

4.2 APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCOV

Todas as 21 amostras fecais testadas para a RT-PCR dirigida ao gene foram positivas para o gene *S*, tendo resultado na banda esperada de 488pb (Figura 3 e Quadro 4), como obtido para a amostra Kakegawa.

As reações referentes aos controles negativos (água DEPC) e os controle negativos de *nested* não produziram quaisquer bandas.

Amostra	Gene S	Gene HE
96	P	P
299	P	N
387	P	N
587	P	P
841	P	P
850	P	P
868	P	P
887	P	P
923	P	P
933	P	N
934	P	P
938	P	P
972	P	P
978	P	P
1005	P	N
1174	P	N
1275	P	P
9146	P	P
9215	P	P
9219	P	P
9224	P	P

P = Positivo N= Negativo

Quadro 4 – Resultados da *nested* RT-PCR e *hemi-nested* RT-PCR para os genes *S* e *HE* de BCoV respectivamente, para amostras fecais utilizadas no presente estudo – São Paulo – 2008

Fonte: SOUZA, S. P. (2008).

Figura 3 – Gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo exemplificando o fragmento esperado de 488pb nos resultados da *nested*-RT PCR dirigida ao gene codificador da proteína S de BCoV, sendo 96, 299, 387, 923, 934, 938, 978, 1005, 1174, 9146, 9215, 9219, 9224 as amostras do presente estudo e CN1, CN2, CN3, CN4 os controles negativos (água DEPC) adicionados na fase da *nested* e C+ e C- os controles adicionados desde a extração – São Paulo – 2008

4.3 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para 14 das 21 amostras positivas para a PCR do gene *S* (96, 299, 587, 841, 850, 868, 887, 923, 933, 934, 938, 9146, 9215, 9224) foram obtidas seqüências com escore ≥ 20 , conforme aferido pelo aplicativo Phred, sendo que, para as amostras 387, 972, 978, 1005, 1174, 1275 e 9219, não foram obtidas seqüências de tal qualidade.

Já para o gene *HE*, 14 das 16 amostras positivas para a *hemi-nested* RT-PCR para este gene resultaram em seqüências com escore Phred ≥ 20 (amostras 96, 587, 841, 850, 868, 887, 923, 933, 934, 938, 972, 1275, 9146, 9219 e 9224), sendo que, para as amostras, 978 e 9215 não foram obtidas seqüências viáveis.

Para cada uma das seqüências obtidas, a análise de BLAST/n confirmou a identidade das mesmas, não tendo esta análise produzido resultados não homólogos aos respectivos genes estudados com escores significativos.

4.4 ANÁLISE GENEALÓGICA

Na árvore de máxima parcimônia para o gene *S* (Figura 4), 14 amostras de BCoV para as quais se obtiveram seqüências segregaram em um cluster politômico com valor de bootstrap de 83, irmão ao grupo de amostras de BCoV originárias de Minas Gerais (TAKIUCHI et al., 2008), sendo estes clusters aqui denominados Grupos 1 e 2, respectivamente, distante do cluster constituído pelas amostras de BCoV relacionadas à coronavirose neonatal bovina previamente descritas no Brasil (BRANDÃO et al., 2006), denominado de Grupo 6 na figura 4, com valor de bootstrap de 63, bem como da amostra de número de acesso AY255831, de mesma origem.

As demais amostras incluídas no alinhamento do gene *S* segregaram em outros 5 clusters, considerados como grupos em função de terem apresentado valores de bootstrap acima de 50% (Figura 4).

Figura 4 - Árvore filogenética enraizada construída com o método de máxima parcimônia e algoritmo heurístico do gene codificador da proteína S do coronavírus bovino, destacando em vermelho as amostra do presente estudo, tendo como dois grupos externos bredavírus bovino (AY427798 e AJ575373). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50% – São Paulo – 2008

Já para a árvore genealógica para o gene *HE* (Figura 5), as 14 amostras de BCoV aqui estudadas segregaram em um cluster altamente politômico em conjunto com outras 21 amostras com seqüências disponíveis no Genbank, com bootstrap de 47 (Grupo 1-2), tendo emergido um terceiro grupo (Grupo 3), constituído pelas seqüências DQ994169 e DQ994170 (valor de bootstrap igual a 66) e um Grupo 4, constituído pelas demais seqüências.

Figura 5 - Árvore filogenética enraizada construída com o método de máxima parcimônia e algoritmo heurístico para o gene codificador da proteína HE do coronavírus bovino, destacando em vermelho as amostras do presente estudo, tendo como dois grupos externos influenza C (M117868 e AM410041). Os números próximos a cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50% (exceto pelo Grupo 1) – São Paulo – 2008

4.5 ANÁLISE DE DIVERSIDADE MOLECULAR

4.5.1 Gene *S*

Entre as 14 amostras de BCoV aqui estudadas (Grupo 1), a identidade de nucleotídeos para a região do gene *S* estudada (nucleotídeos 1381 a 1712 do gene *S* em relação à amostra Mebus de número de acesso Genbank U00735) foi de 100%.

Comparando-se este grupo com os Grupos 2 e 6 e de amostras brasileiras (Figura 4), as identidades médias de nucleotídeos e os desvios-padrão foram de 98,10% / 0% e 90,16% / 0,27%.

Ainda, o Grupo 1 resultou em identidade média de 98,1% quando comparada à amostra brasileira de número de acesso AY255831.

Considerando-se todas as 65 seqüências de gene *S* de BCoV incluídas para a análise genealógica, a identidade média de nucleotídeos foi de 95,21% com desvio-padrão de 3,6%.

Os demais valores de identidades e desvios-padrão inter e intra-grupos encontram-se descritos na tabela 1.

Após a remoção de seqüências 100% idênticas em nucleotídeos e aminoácidos, restaram 13 seqüências, sendo que os Grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 8 foram representados por apenas uma seqüência e os Grupos 6 e 7 por 4 e 2 seqüências, respectivamente (Figura 6), além da seqüência brasileira de número de acesso AY255831, não incluída em grupos .

Tabela 1 - Identidade de nucleotídeos em porcentagem inter e intra grupos para o gene *S* do coronavírus bovino (nucleotídeos 1381 a 1712) e respectivos desvios-padrão para amostras analisadas no presente estudo e seqüências homólogas recuperadas do GenBank - São Paulo- 2008

Grupos	1	2	3	4	5	6	7	8
1	100%/	98,10%/	96,75%/	97,42%/	96,90%/	90,16%/	97,05%/	97,95%/
	0%	0%	0,15%	0,13%	0%	0,27%	0,15%	0,15%
2	98,10%/	100%/	96,75%/	97,43%/	97,20%/	90,46%/	96,75%/	97,65%/
	0%	0%	0,16%	0,14%	0%	0,27%	0,16%	0,16%
3	96,75%/	96,75%/	100%/	98,48%/	96,15%/	90,61%/	95,70%/	98,10%
	0,15%	0,16%	0%	0,21%	0,17%	0,31%	0,24%	0,24%
4	97,42%/	97,43%/	98,48% /	100%/	96,83%/	90,68%/	96,38%/	98,18%/
	0,13%	0,14%	0,21%	0%	0,14%	0,30%	0,21%	0,21%
5	96,90%/	97,20%/	96,15% /	96,83% /	100%/	91,16%/	96,60%/	97,05%/
	0%	0%	0,17%	0,14%	0%	0,39%	0%	0,17%
6	90,16%/	90,46%/	90,61% /	90,68%/	91,16%/	100%/	90,10%/	90,61%/
	0,27%	0,27%	0,31%	0,30%	0,39%	0%	0,27%	0,30%
7	97,05%/	96,75%/	95,70% /	96,38% /	96,60%/	90,10%/	100%/	96,90%/
	0,15%	0,16%	0,24%	0,21%	0%	0,27%	0%	0,24%
8	97,95%/	97,65%/	98,10%/	98,18% /	97,05%/	90,61%/	96,90%/	100%/
	0,15%	0,16%	0,24%	0,21%	0,17%	0,30%	0,24%	0%

Entre o Grupo 1 (amostras do presente estudo) e os Grupos 2 e 6 de amostras brasileiras, as identidades médias de aminoácidos e desvios-padrão para a região estudada (aminoácidos 463 a 556) foram de 97%/ 0 e 86%/ 0 , tendo sido detectadas substituições de aminoácidos em 17 sítios (Quadro 5 e Figura 6), dos quais nove foram identificados como susceptíveis a substituições entre aminoácidos de classes distintas (não similares), nas posições 463, 464, 470, 501, 508, 510, 524, 531 e 543.

Posição do aminoácido no gene S	USP-01 (AY 255831.2)	1	2	3	4	5	6	7	8
463	Q ^p	-	-	-	P ^{np}	P ^{np}	-/P ^{np} /L ^{np}	-	P ^{np}
464	H ^{p+}	L ^{np}	P ^{np}	P	-	-	P ^{np}	P ^{np}	-
465	A ^{np}	-	-	-	-	-	V ^{np}	-	-
466	G ^p	-	-	-	-	-	S	-	-
470	D ^{p-}	-	-	-	-	-	H ^{p+}	-	-
499	S ^p	-	-	-	-	N ^p	N	-/T ^p	-
501	S ^p	-	-	-	-	P ^{np}	L ^{np}	-	-
508	K ^{p+}	-	-	-	-	-	Q	-	-
509	N ^p	-	-	-	-	T ^p	-	-	-
510	T ^p	-	I ^{np}	-	-	-	S ^p	S ^p	-
520	N ^p	T ^p	-	-	-	-	-	-	-
524	C ^p	-	-	-	-	-	-	V ^{np}	-
531	D ^{p-}	-	-	-	-	-	-	-	N ^p
532	C ^p	-	-	-	-	-	S ^p	-	-
543	A ^{np}	-	-	-	-	-	S ^p	-	-
547	N ^p	Y ^p	Y ^p	Y ^p	Y ^p	Y ^p	Y ^p	Y ^p	Y ^p
556	V ^{np}	-	-	-	-	-	-/A ^{np}	-	-

^p = polar ^{np} = não polar ^{p+} = polar positivamente carregado ^{p-} = polar negativamente carregado

Quadro 5 - Substituições de aminoácidos nos grupos da proteína S de seqüências de coronavírus bovino incluídas no respectivo estudo de acordo com sua classe - São Paulo – 2008

Figura 6 - Alinhamento de um segmento de 110 aminoácidos dos grupos da região hipervariável da subunidade S1 da proteína S de coronavírus bovino correspondentes aos resíduos das posições 461 a 570 da proteína S, tendo como referência a amostra AY255831.2. O grupo G1 refere-se ao grupo de seqüências que fazem parte do presente estudo – São Paulo – 2008

4.5.2 Gene *HE*

Entre as 14 amostras de BCoV aqui estudadas (Grupo 1), a identidade de nucleotídeos para a região do gene *HE* (nucleotídeos 158 a 527 do gene *HE* em relação à amostra Mebus de número de acesso Genbank U00735) foi de 100%.

Considerando-se todas as 43 seqüências do gene *HE* de BCoV incluídas para a análise genealógica, a identidade média de nucleotídeos foi de 99,20% com desvio-padrão de 0,48%.

Os demais valores das identidades e desvios-padrão inter e intra-grupos encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Identidade de nucleotídeos em porcentagem inter e intra grupos para o gene *HE* do coronavírus bovino (nucleotídeos 158 a 527) e respectivos desvios-padrão para amostras analisadas no presente estudo e seqüências homólogas recuperadas do GenBank - São Paulo - 2008

Grupos	1	2	3	4
1	100% / 0%	99% / 0%	98,90% / 0%	99% / 0%
2	99% / 0%	99% / 0%	99,29% / 0,38%	99% / 0%
3	98,90% / 0%	99,29% / 0,38%	100% / 0%	98% / 0%
4	99% / 0%	99% / 0%	98% / 0%	100% / 0%

Após a remoção de seqüências 100% idênticas em nucleotídeos e aminoácidos, restaram 15 seqüências, sendo que os grupos 1 e 3 foram representados por apenas uma seqüências e os grupos 2 e 4 por 8 e 5 seqüências, respectivamente (Figura 7).

Entre o Grupo 1 (amostras do presente estudo) e os grupos 2, 3 e 4 de amostras do GenBank, as identidades médias de aminoácidos e desvios-padrão para a região estudada (aminoácidos 66 a 173) foram de 99%/1%, 98%/0% e 99%/1%, tendo sido detectadas substituições de aminoácidos em 11 sítios (Quadro 6), dos quais 7 foram identificados como susceptíveis a substituições entre aminoácidos de classes distintas (não similares), nas posições 66, 72, 104, 109, 114, 124 e 158.

Posição do aminoácido no gene <i>HE</i>	1	2	3	4
66	D ^{p-}	G ^{p/-}	G ^p	-
72	S ^p	-/A ^{Np}	-	-
103	V ^{np}	-	-	-/L ^{np}
104	N ^p	-	-	-/L ^{np}
109	H ^{p+}	-	-	-/Y ^p
114	T ^p	-/I ^{Np}	-	-
124	Q ^p	-	-	-/H ^{p+}
133	V ^{np}	-	-	-/L ^{np}
158	S ^p	-/P ^{np}	-	-
161	L ^{np}	-/I ^{Np}	-	-
173	A ^{np}	-	V ^{np}	-

^p = polar ^{np} = não polar ^{p+} = polar positivamente carregado ^{p-} = polar negativamente carregado

Quadro 6 - Substituições de aminoácidos nos grupos da proteína HE de seqüências de coronavírus bovino incluídas no respectivo estudo de acordo com sua classe - São Paulo - 2008

Figura 7- Alinhamento de um segmento de 122 aminoácidos dos grupos do gene *HE* de coronavírus bovino correspondentes aos resíduos das posições 54 a 175 da proteína HE, tendo como referência o grupo G1, do qual fazem as amostras parte deste estudo – São Paulo - 2008

DISCUSSÃO

*“Grandes coisas faremos e para sempre seremos lembrados, mesmo quando só
restarem os papers”.*

Paulo Eduardo Brandão

5 DISCUSSÃO

Na presente investigação, amostras entéricas de coronavírus bovino detectadas durante o transcorrer de um surto de disenteria em bovinos adultos foram estudadas quanto sua diversidade genética, considerando-se os genes codificadores das proteínas de espícula e hemaglutinina-esterase, revelando linhagens do vírus ainda não descritas.

Inicialmente, decidiu-se padronizar uma reação de *hemi-nested* RT-PCR para a amplificação do segmento do gene *HE* a ser seqüenciado, visto que a RT-PCR descrita por Villarreal et al. (2004), quando aplicada as 21 amostras incluídas neste estudo, não resultou em amplicons de alta concentração para a maioria destas amostras, possivelmente em função de sua baixa sensibilidade em relação a amostras de BCoV; esta RT-PCR foi padronizada como um método para estudos do gene *HE* em coronavírus do Grupo 2 de um modo genérico e não havia sido testada em amostras fecais de bovino.

Para tanto, foi desenhado um primer interno ao produto da primeira reação, sendo que a análise de BLAST/n não resultou em seqüências não-homólogas, o que permite inferir, até este ponto, que, teoricamente, não haveria amplificações não específicas com o uso deste primer (HE-NA), permitindo amplificação específica de parte do gene *HE* para seqüenciar.

Ainda que este primer tenha sido desenhado especificamente com base em seqüências derivadas do gene *HE* de BCoV, a proximidade genética entre esta espécie e outras espécies de coronavírus pertencentes ao Grupo 2, como, por exemplo, o coronavírus humano OC43, (VIJGEN et al. 2006), poderia permitir sua aplicação a estudos de diversidade molecular nestas espécies.

Como descrito no item 4.1.1 dos resultados, as temperaturas de hibridação ótimas para a utilização do primer HE-NA na reação de *hemi-nested* em conjunto com o primer CHES foi de 53,4°C, superior àquela utilizada para a primeira amplificação (50°C) com os primers CHES e CHEA. Este resultado permite atribuir à reação de *hemi-nested* uma maior especificidade analítica, visto que, quanto maior a temperatura de hibridação de primers, menor a ocorrência de amplificações não específicas (ABRAMSON, 1999), o que é fundamental para a eficiência das amplificações e reações de seqüenciamento de DNA.

Para a determinação da temperatura de hibridação ótima para a reação de *hemi-nested*, utilizou-se tanto uma das amostras de campo do presente estudo (amostra 96) e a amostra Kakegawa, sendo que, para esta última, não se obtiveram quaisquer amplificações.

Uma das possibilidades pode ser que o excesso de RNA genômico ou cDNA em função do elevado título da amostra Kakegawa tenha inibido as reações de transcrição-reversa ou PCR, pois sabe-se que excesso de ácidos nucleicos pode levar a este efeito (KRIEG; JOHNSON, 1996).

Além disso, deve-se sugerir que haveria a possibilidade da ausência de hibridação suficiente do primer HE-NA com a amostra Kakegawa em função de diversidade de nucleotídeos na região-alvo, a qual não foi avaliada no desenho de primers em função na inexistência de seqüências do gene *HE* para esta amostra quando se conduziu o desenho de primers.

Finalmente, é possível ainda que artefatos de técnica, como falhas de operação, reagentes ou equipamentos nas fases de extração de RNA, síntese de cDNA ou amplificação possam ter levado a resultados falso-negativos.

Entretanto, a região utilizada como alvo para o primer HE-NA é altamente conservada entre amostras de BCoV (SOUZA et al. , 2008b) e a mesma amostra Kakegawa, quando utilizada como controle positivo para a aplicação da *hemi-nested* RT-PCR às amostras de campo, resultou positiva de um modo consistente, o que descarta as possibilidades de excesso de ácidos nucleicos e de ausência de hibridação de primers, sendo artefatos pontuais de técnica a razão mais provável para a ausência de amplificação nesta fase da padronização.

O resultado obtido em relação ao limiar de detecção, quando se conseguiu a detecção do fragmento de 441pb do gene *HE* para a amostra Kakegawa até a diluição 10^{-6} foi inferior ao descrito por Asano et al. (2008) e Takiuchi et al. (2006) que obtiveram amplificações até a diluição 10^{-7} .

Este resultado pode ser devido à região genômica escolhida como alvo da região codificadora da proteína HE, que apresenta maior diversidade quando comparada à região codificadora da proteína N, região altamente conservada (CHO et al., 2001).

Todavia, a *hemi-nested* aqui padronizada, ao contrário das técnicas anteriormente citadas, não tem finalidade de diagnóstico, mas sim de geração de fragmentos do gene *HE* para seqüenciamento de DNA em estudos de diversidade molecular, não sendo recomendável sua aplicação como método de diagnóstico de triagem para BCoV.

A aplicação da *hemi-nested* RT-PCR assim padronizada resultou os produtos esperados de 441pb para apenas 16 das 21 amostras estudadas, sabidamente positivas para a presença de BCoV, sendo que, para as cinco demais amostras, não se obtiveram quaisquer amplificações.

Variações nas seqüências-alvo no gene *HE* poderiam, teoricamente, impedir uma eficiente hibridação de primers, impedindo, assim, a detecção do fragmento esperado; entretanto, dada à alta conservação da região eleita para desenho de primers (SOUZA et al., 2008b), pode-se argumentar que esta não é uma causa provável.

Outro motivo que poderia levar a estes resultados seria o baixo título viral nas amostras fecais associado ao tempo de conservação das amostras em freezer (cinco anos), o que poderia levar à degradação do RNA viral.

Entretanto, uma vez que todas as 21 amostras testadas foram positivas para a *nested*-RT PCR dirigida ao gene *S*, pode-se considerar como pouco plausível a hipótese de baixo título viral e degradação de RNA viral por conservação, visto que falhas para esta reação para o gene *S* também deveriam ocorrer caso fosse esse o motivo.

Em função de resultados positivos para o gene *HE* haverem ocorrido simultaneamente a resultados negativos durante a execução deste estudo, pode-se, paralelamente, desconsiderar, neste caso, artefatos de técnica como falhas em etapas de extração de RNA, síntese de cDNA e amplificações, visto que tais resultados positivos, inclusive aqueles referentes ao próprio controle positivo (amostra Kakegawa) validam os diagnósticos realizados.

Assim sendo, sugere-se que otimizações a serem estabelecidas na reação aqui padronizada poderiam permitir a amplificação do segmento do gene *HE* nas amostras para as quais ocorreram falhas, como, por exemplo, aumento nas concentrações de DNA polimerase ou mesmo testes com diferentes volumes de RNA para a fase de transcrição-reversa e DNA para as amplificações (SAMBROOK; RUSSELL, 1996).

Ao se submeterem os fragmentos amplificados à reação de seqüenciamento de DNA, também foram observadas falhas, visto que, para o gene *S*, 14 dos 21 fragmentos resultaram em seqüências com escore Phred maior ou igual a 20, sendo que, para os fragmentos do gene *HE*, 14 dos 16 fragmentos tiveram tal resultado.

Mais possivelmente, o insucesso na geração de seqüências viáveis para todos os fragmentos obtidos nas PCRs deva-se à insuficiente concentração de DNA nos mesmos após as

amplificações ou mesmo após sua purificação a partir dos géis de agarose, processo este que pode ter levado a perdas de DNA durante sua realização.

Seguramente, do mesmo modo que se sugere anteriormente em relação às reações de PCR, etapas de padronização nas reações de seqüenciamento, sobretudo as concentrações de primers e DNA-alvo (SAMBROOK; RUSSELL, 1996), poderiam levar à obtenção de seqüências para um maior número de amostras.

As árvores genealógicas obtidas para estes fragmentos apresentadas nas figuras 4 e 5 demonstraram que, para o gene *S*, todas as amostras estudadas segregaram um grupo único, isolado dos grupos formados por outras seqüências de amostras já detectadas no Brasil, como aquelas descritas por Brandão et al. (2006) e Takiuchi et al. (2008) no Estado de Minas Gerais.

Associando-se a variável ano de colheita de amostra, o Grupo 6 é constituído por amostras de bovinos neonatos colhidas nos anos de 2001 e 2002 (BRANDÃO et al. 2006), sendo que as amostras aqui estudadas (Grupo 1) foram colhidas em 2003 e aquelas do Grupo 2 em 2004 (TAKIUCHI et al., 2008).

Assim, ainda que as amostras dos Grupos 1 e 2 tenham sido colhidas em anos diferentes, o fato de amostras de anos diferentes terem segregado em conjunto no Grupo 6 faz com que a variável “ano de detecção” não tenha sido a determinante nos eventos que levaram ao padrão de segregação observado.

A existência de marcadores para a diferenciação entre amostras de BCoV detectadas em animais adultos com disenteria de inverno e aquelas detectadas em diarreia neonatal não foram relatadas até o momento (LIU et al., 2006).

Neste sentido, os dados aqui apresentados para a genealogia do gene *S* são concordantes com este fato, visto que, ainda que apenas amostras de vacas tenham sido incluídas no presente estudo, o Grupo 6 é constituído não apenas por amostras de BCoV de bovinos neonatos, mas também por uma amostra derivada de disenteria de inverno em uma vaca no Estado de São Paulo (seqüência de número de acesso AY353075).

Com isto, a variável que pode ser aqui associada é a região geográfica de origem da amostra, visto que as amostras do Grupo 1 (aqui estudadas) foram originárias de um único surto em uma fazenda de Paranapanema, enquanto que aquelas constituintes do Grupo 6, brasileiras, foram colhidas em cidades distantes de SP e MG.

Além disso, associando-se os dados de origem das demais seqüências apresentados no quadro 2, pode-se argumentar que grupos com tendência a padrões geográficos emergiram desta árvore, como os grupos 3, com seqüências da Coreia do Sul, Grupo 4 com seqüências da Coreia do Sul e Japão, países geograficamente próximos, Grupo 7, representado por seqüências de BCoV da Itália e Grupo 8, constituído por seqüências de amostras do Canadá.

Somando-se estes dados em relação ao gene *S*, podemos sugerir que amostras de coronavírus bovino podem ser separadas em diferentes genótipos, próprios de específicas regiões e países.

Considerando-se o padrão de segregação de grupos brasileiros apresentados na filogenia para o gene *S*, pode-se inferir, ainda, que houve diferentes introduções de linhagens de BCoV no Brasil, visto que, segundo a árvore enraizada, os nós intermediários são de amostras não brasileiras, que passaram por processos de especiação diferentes em outros países.

Para a análise genealógica do gene *HE*, houve concordância com o que foi encontrado para o gene *S*, pois todas as 14 amostras para as quais se obtiveram seqüências do gene *HE*, das quais 11 estavam também representadas na árvore para o gene *S*, segregaram novamente em um único grupo (Figura 4 e 5).

Uma primeira análise que pode ser delineada a partir destes resultados é que não houve recombinações entre as amostras brasileiras encontradas no surto aqui estudado, visto que, se houvesse, o padrão de segregação das mesmas e a topologia das árvores seriam não concordantes para os dois genes estudados.

Entretanto, encontrou-se uma grande politomia para o grupo que contém as amostras do presente estudo (Grupo1) e amostras de diversas regiões do mundo (Grupo 2).

Tal politomia pode ser devida à ausência de diferenciação pelo reduzido tamanho da seqüência do gene *HE* estudada e pela ausência de polimorfismos na mesma, gerando uma politomia superficial (MATIOLI, 2001).

Assim, sugere-se que o seqüenciamento de uma área maior do gene *HE* ou a eleição de outra área com maior polimorfismo possa levar a uma topologia mais resolvida, para uma diferenciação mais acurada entre diversas amostras de BCoV e validação do gene *HE* para a epidemiologia molecular das coronaviroses.

Entretanto, a escassez de dados relativa ao gene *HE*, quando comparados àqueles disponíveis para o gene *S*, além do fato de serem as seqüências aqui apresentadas as únicas

relativas a amostras brasileiras de BCoV até o momento, não permite que seja determinado se a politomia é de fato superficial ou se, ao contrário, é profunda, na qual não há diferenciação possível entre linhagens.

Em relação às análises de diversidade de nucleotídeos para as regiões estudadas dos genes *S* e *HE*, todas as amostras aqui estudadas apresentaram identidades de 100%, não tendo sido encontrada nenhuma mutação, o que, associado ao fato de o BCoV ter sido o único patógeno implicável na etiologia da doença observada (BRANDÃO et al., 2007), permite-se inferir que, durante o transcorrer do surto, uma única linhagem de BCoV estava envolvida no desencadeamento da doença.

Uma vez que o surto teve uma duração de apenas 3 dias e 80% dos animais foram acometidos, é plausível afirmar que a ausência de diversidade molecular entre as amostras de BCoV estudadas é devida à elevada velocidade de transmissão do vírus entre os animais e ao baixo número populacional dos hospedeiros, visto que o tempo de geração dos coronavírus, apesar de ser este um vírus RNA cuja replicação de RNA genômico pode ser detectada em menos de uma hora após a infecção em células (SUNGWHAN; MAEDA; MAKINO, 1998), com taxas de mutação próxima de 10^{-4} e taxas de recombinação de RNA de 20% (BARIC et al., 1997; ROTTIER, 1999; MOYA et al., 2000).

Esta rápida transmissão de uma única linhagem de BCoV pode ter sido consequência não apenas da elevada excreção viral, mas também por condições de manejo inadequadas, como, por exemplo, falta de higienização de fômites como equipamentos e instalações ou mesmo por tratadores e médicos veterinário (LIU et al., 2006; PRATELLI, 2006; HASOKSUZ, et al., 2007).

Quanto à origem da linhagem de BCoV envolvida no surto, pode-se especular que a mesma estivesse sendo mantida em um nível endêmico em bezerros, por exemplo, visto que a transmissão entre estes e animais adultos já foi sugerida como tendo um papel no desencadeamento de disenteria de inverno (CROUCH et al., 1985; LIU et al., 2006).

Ainda, há a possibilidade de que esta linhagem de BCoV estivesse sendo mantida nas próprias vacas que se comportam como portadores-sãos fora de períodos epidêmicos (PARK et al., 2006; DECARO et al., 2007), sendo que, devido a possíveis alterações ambientais, como, por exemplo, estresse térmico, a ocorrência de imunossupressão permitiria a manifestação da doença (DECARO et al., 2007).

Além disso, a introdução da linhagem em questão a partir de outra propriedade, vizinha àquela estudada, levando ao surto, é uma possibilidade que poderá ser esclarecida com estudos mais amplos de rastreamento de focos embasados em epidemiologia molecular na região geográfica.

Em relação às amostras do Grupo 6 na árvore para o gene *S*, todas apresentavam a deleção de 18 nucleotídeos (BRANDÃO et al., 2007) apresentada na figura 4 e 6, entretanto, nas amostras aqui estudadas, esta deleção não foi encontrada, o mesmo tendo sido descrito por Takiuchi et al. (2008).

Pode-se, assim, interpretar este achado como mais uma evidência à tendência de micro-regionalização das linhagens de BCoV que ocorrem no Brasil, o que permite a detecção de assinaturas genéticas para estas linhagens aplicáveis primariamente não apenas ao desenvolvimento de métodos de diagnóstico baseados em biologia molecular do gene para a diferenciação entre as mesmas (SOUZA et al., 2008a), mas também para o estabelecimento da cadeia de transmissão por meio de epidemiologia molecular com vistas à identificação de fontes de infecção e origem de focos.

Por sua vez, a análise de diversidade de nucleotídeos para o gene *HE* demonstrou um menor polimorfismo quando comparado ao encontrado para o gene *S*, visto que a identidade média de nucleotídeos para *HE* foi de 99,20% e 95,1% para *S*; além disso, o desvio-padrão para o gene *HE* foi de 0,48%, enquanto que, para o gene *S*, este valor foi de 3,6%.

Estes resultados permitem argumentar que o gene *HE* é mais conservado entre diferentes amostras de BCoV quando comparado ao gene *S*, considerando-se as regiões gênicas aqui estudadas.

Uma das razões que embasam estes resultados é o fato da proteína S ser responsável pela ligação vírus-receptor celular e fusão de membranas, sendo, portanto, o principal alvo para anticorpos neutralizantes (COLLINS et al., 1982), sofrendo maior pressão de seleção e, logo, apresentando maior taxa de mutação quando comparada às demais proteínas dos coronavírus, como, por exemplo, a proteína hemaglutinina-esterase, a qual tem função como ligação a receptores secundários e para a qual um menor polimorfismo é de fato esperado (CLARK, 1993).

Observando-se as seqüências obtidas em sua forma traduzida para a proteína HE, as identidades médias de aminoácidos entre os Grupos 1 e 2 foi de 97%, 1 e 3 98,90% e 1 e 4 99%, contrapondo à maior diversidade de aminoácidos para a proteína S (97% entre os Grupos 1 e 2 e

86% entre o Grupos 1 e 6), demonstrando que, de fato, as mutações encontradas na sequência gênica de S estudada e seu elevado polimorfismo relativo são devidos à pressão de seleção sobre a proteína S.

Este fato pode ser atribuído diretamente à relação parasita-hospedeiro, onde ambos co-evoluem de forma paralela, sobretudo em se considerando a reposta imune e a seleção de linhagens capazes de evadir esta reposta (MATIOLI, 2001; FORATINI, 2005), tendo como possíveis consequências alterações antigênicas na proteína S.

Para a região de 110 aminoácidos da região S1 da proteína S correspondentes (posições 461 a 570) às sequências de DNA obtidas, 17 apresentaram substituições de aminoácidos (Quadro 6).

Destas 17 posições, 8 já foram descritas como susceptíveis a eventos de substituição (JEONG et al., 2005; KANNO et al., 2007): posições 465, 470, 499, 501, 509, 510, 531 e 543.

Entretanto, para as posições 499, 501 e 510, a presença dos aminoácidos T, L e I, respectivamente não havia, até o momento, sido descritas, onde na posição 499 os aminoácidos S e N foram substituídos por T ambos polares no Grupo 7, já na posição 501 os aminoácidos S e P são substituídos por L, sendo estas substituições entre classes de aminoácidos, na posição 510 o aminoácido I (não-polar) é substituído por T e S (polares).

Paralelamente, variações de aminoácidos nas demais posições, não haviam sido descritas na literatura consultada até o momento, sendo que em oito destas apresentaram substituições por aminoácidos de classes químicas diferentes (Quadro 5).

Em relação ao polimorfismo de aminoácidos do gene *S* para o Grupo 1 (amostras do presente estudo), houve substituições grupo-exclusivas nas posições 464, onde este grupo apresentou o aminoácido L (não-polar) em substituição a H (polar carregado positivamente) e P (não-polar), bem como na posição 520, onde o Grupo 1 apresentou T (polar) em substituição a N (polar).

Por sua vez, considerando-se a sequência putativa para a proteína HE, de 122 aminoácidos das posições 54 a 175, das 11 posições onde houve substituição de aminoácidos, duas já haviam sido previamente descritas (KO et al., 2006): posições 66 e 173, com os aminoácidos G/D (uma substituição entre aminoácidos de classes distintas) e A/V, respectivamente.

Para as nove posições restantes, previamente não descritas como susceptíveis a substituições, ocorreram sete substituições por aminoácidos de classes diferentes (Quadro 6).

Pode-se, com isto, considerar que os aminoácidos L464 e T520 em *S* sejam marcadores moleculares próprios das amostras aqui estudadas. Tais marcadores podem não só ser utilizados para a diferenciação entre estas linhagens de BCoV por meio de seqüenciamento de DNA, como realizado no presente estudo, mas também para tipificações antigênicas como, por exemplo, reações sorológicas baseadas em anticorpos monoclonais.

A disenteria de inverno é ainda uma doença complexa em sua epidemiologia, sobretudo em relação à transmissão de linhagens de BCoV entre bovinos adultos e neonatos e o aprimoramento dos estudos aqui apresentados, como, por exemplo, investigações baseadas em proteínas não-estruturais do vírus envolvidas na patogenia, acompanhamento longitudinal em fazendas onde esta doença ocorre e inclusão de amostras de outras regiões do País.

Paralelamente, a utilização de epidemiologia molecular com vistas ao rastreamento de focos e de dados moleculares para a elucidação da história evolutiva do coronavírus bovino permite perspectivas para estudos continuados em relação não apenas às coronaviroses animais, mas, também, para a própria Virologia.

CONCLUSÕES

*“Não importa o quantas vezes escrevemos interessante e sim o quanto
interessante é o que escrevemos”.*

Paulo Eduardo Brandão

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos na presente pesquisa e embasados pela literatura consultada permitiram chegar-se às conclusões que se seguem:

- Padronizou-se uma hemi-nested RT-PCR para o gene codificador da proteína hemaglutinina-esterase (HE) do coronavírus bovino (BCoV) para a aplicação em amostras fecais bovinas para estudos subseqüentes em diversidade molecular.
- Durante o transcorrer do surto de disenteria de inverno em uma propriedade leiteira investigado, uma única linhagem de BCoV estava presente, com base no seqüenciamento parcial dos genes *S* e *HE*.
- Há três genótipos de BCoV presentes no Brasil em relação ao gene *S* e ao menos um em relação ao gene *HE*, considerando-se as regiões gênicas e as seqüências incluídas no presente estudo.

REFERÊNCIAS

“A mais bela das estéticas é a matemática”.

Paulo Eduardo Brandão

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S.; KIENZLE, T. E.; LAPPS, W.; BRIAN, D. A. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. **Virology**, v. 176, p. 296-301, 1990.
- ABRAMSON, R. D. Thermostable and polymerases: an update. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. (Ed.). **PCR applications: protocols for functional genomics**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 40.
- 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.
- ASANO, K. M.; SOUZA, S. P.; SILVA, S. O. S.; MARTINS, J.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Rapid detection of bovine Coronavirus by a semi-nested polymerase chain reaction. **Virus Reviews and Research**, v. 13, p. 125, 2008. Trabalho apresentado no XIII Encontro Nacional de Virologia, 2008, Caxambú.
- BARIC, R. S.; YOUNT, B.; HENSLEY, L.; PEEL, S. A.; CHEN, W. Episodic evolution mediates interspecies transfer of a murine coronavirus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 1946-1955, 1997.
- BARRERA, M. V.; RODRÍGUEZ, E. B.; BETANCOURT, A. M.; FRÍAS, M. T. L.; BRANDÃO, P. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, 2006.
- BRANDÃO, P. E.; VILLARREAL, L. Y. B.; GREGORI, F.; SOUZA, S. L. P.; LOPES, M. A. E.; GOMES, C. R.; SFORSIN, A. J.; SANCHES, A. A.; ROSALES, C. A. R.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, A. J. P.; JEREZ, J. A. On the etiology of an outbreak of winter dysentery in dairy cows in Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, 2007.
- BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J.; ROSALES, C. A. R.; VILLARREAL, L. Y. B.; JEREZ, J. A. Molecular diversity of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. **Archives of Virology**, Áustria, v. 151, n. 9, p. 1735-1748, 2006.

BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; VILLARREAL, L. Y. B.; ROSALES, C. A. R.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. A nested polymerase chain reaction to Bovine Coronavirus diagnosis based on the RNA-dependent RNA-polymerase gene. **Virus Reviews & Research**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2005.

BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; MONTELEONE, G. S.; SOARES, R. M.; ROSALES, C. A. R.; JEREZ, J. A. Nested PCR assay for detection of bovine coronavirus S1 gene. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 70, n. 1, p. 1-3, 2003.

BRANDÃO, P. E.; BIRGEL JR., E. H.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; RUIZ, V. L. A.; JEREZ J. A. Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 2, p. 103-104, 2002.

CALENDINI, F.; MARTIN, J.F. PaupUP: a free graphical frontend for Paup* Dos software, versão: 1.0.3.1. Washington: PHYLIP, 2005.

CAMPBELL, S. G.; COOKINGHAM, C. A. The enigma of winter dysentery. **Cornell Veterinarian**, v. 68, p. 423-441, 1978.

CAVANAGH, D. The coronavirus surface glycoprotein. In: SIDDELL, S. G. **The coronaviridae**. New York: Plenum, 1995. p. 73-113.

CHO, K. O.; HASOKSUZ, M.; NIELSEN, P. R.; CHANG, K. O.; LATHROP, S.; SAIF, L. J. Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. **Archives of Virology**, v. 146, n. 12, p. 2401-2419, 2001.

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.

CROUCH, C. F.; BIELEFELDT OHMANN, H.; WATTS, T. C.; BABIUK, L. A. Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows. **Journal of Genetic Virology**, v. 66, p. 1489-500, 1985.

CYR-COATS, K. S. T.; STORZ, J. Bovine coronavirus-induced cytopathic expression and plaque formation: host cell and virus strain determine trypsin dependence. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 35, p. 48-56, 1988.

DECARO, N.; MARI, V.; DESARIO, C.; CAMPOLO, M.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; GRECO, G.; CIRONE, F.; COLAIANNI, M. L.; CORDIOLI, P.; BUONAVOGLIA, C. Severe outbreak of bovine coronavirus infection in dairy cattle during the warmer season. **Veterinary Microbiology**, v. 126, p. 30-39, 2007.

DURHAM, P. J.; HASSARD, L. E.; ARMSTRONG, K. R.; NAYLOR, J. M. Coronavirus-associated diarrhea (winter dysentery) in adult cattle. **Canadian Veterinary Journal**, v. 30, n. 10, p. 825-827, 1989.

EMBRAPA GADO DE LEITE; CENTRO DE INTELIGÊNCIA DO LEITE. Produção mineiro de leite será recorde. Disponível em: < <http://www.cileite.com.br/jornaldoleite2.php?id=38> >. Acesso em: 01/12/08.

FORATTINI, O. P. **Conceitos básicos de epidemiologia molecular**. São Paulo: Edusp, 2005. 144 p.

FUKUTOMI, T.; TSUNEMITSU, H.; AKASHI, H. Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. **Archives of Virology**, v. 144, n. 5, p. 997-1006, 1999.

GONZÁLEZ, J. M.; GOMEZ-PUERTAS, P.; CAVANAGH, D.; GORBALENYA, A. E.; ENJUANES, L. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. **Archives of Virology**, v. 148, n. 11, p. 2207-2235, 2003.

GÉLINAS, A. M.; BOUTIN, M.; SASSEVILLE, A. M.; DEA, S. Bovine coronaviruses associated with enteric and respiratory diseases in Canadian dairy cattle display different reactivities to anti-HE monoclonal antibodies and distinct amino acid changes in their HE, S and ns4.9 protein. **Virus Research**, v. 76, n. 1, p. 43-57, 2001.

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

HASOKSUS, M.; ALEKSEEV, K.; VLASOVA, A.; ZHANG, X.; SPIRO, D.; HALPIN, R.; WANG, S.; GHEDIN, E.; SAIF, L. J. Biologic, antigenic, and full-length genomic

characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. **Journal Virology**, v. 81, n.10, p. 4981-4990, 2007.

HECKERT, R. A.; SAIF, L. J.; HOBLET, K. H.; AGNES, A. G. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds in Ohio. **Veterinary Microbiology**, v. 22, p. 187-201, 1990.

HECKERT, R. A.; SAIF, L. J.; MYERS, G. W.; AGNES, A. G. Epidemiologic factors and isotype-specific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 6, p. 845-851, 1991.

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.

HONDA, E.; TAKAHASHI, H.; OKAZAKI, K.; MINETOMA, T.; KUMAGAI, T. The multiplication of transmissible gastroenteritis viruses in several cell lines originated from porcine kidney and effects of trypsin on the growth of the viruses. **Japanese Journal of Veterinary Sciences**, v. 52, n. 2, p. 217-224, 1990.

HORNER, G.W.; HUNTER, R.; KIRKBRIDE, C. A. A coronavirus-like agent present in faeces of cows with diarrhoea. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 23, n. 5, p. 98, 1975.

JEONG, J. H.; KIM, G. Y.; YOON, S. S.; PARK, S. J.; KIM, Y. J.; SUNG, C. M.; SHIN, S. S.; LEE, B. J.; KANG, M. I.; PARK, N. Y.; KOH, H. B.; CHO, K. O. Molecular analysis of S gene of spike glycoprotein of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. **Virus Research**, v. 108, n. 1-2, p. 207-212, 2005.

KANNO, T.; HATAMA, S.; ISHIRARA, R.; UCHIDA, I. Molecular analysis of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1218-1224, 2007.

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.

KO, C. K.; KANG, M. I.; LIM, G. K.; KIM, G. Y.; YOON, S. S.; PARK, J. T. JEONG, C.; PARK, S. H.; PARK, S. J.; KIM, Y. J.; JEONG, J. H.; KIM, S. K.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; KIM, K. Y.; CHO, K. O. Molecular characterization of HE, M, and E genes of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2003. **Virus Genes**, v. 32, p. 129-136, 2006.

KOURTESIS, A. B.; GÉLINAS, A. M.; DEA, S. Genomic and antigenic variations of the HE glycoprotein of bovine coronaviruses associated with neonatal calf diarrhea and winter dysentery. **Archives of Virology**, v. 146, n. 6, p. 1219-1230, 2001.

KRIEG, P. A.; JOHNSON, A. D. Invitro synthesis of mRNA. In: KRIEG, P. A. (Ed.). **A laboratory guide to RNA: isolation, analysis, and synthesis**. New York: Wiley-Liss, 1996. p. 146.

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.

LIU, L.; HÄGGLUND, S.; HAKHVERDYAN, M.; ALENIUS, S.; LARSEN, L. E.; BELÁK, S. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 957-960, 2006.

LUO, Z.; WEISS, S. R. Roles in cell-to-cell fusion of two conserved hydrophobic regions in the murine coronavirus spike protein. **Virology**, v. 244, p. 483-494, 1998.

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.

MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.

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.

MONTELEONE, G. S.; BIRGEL J. R, E. H.; BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; RUIZ, V. L. A.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A. Bovine Coronavirus detection in adult cows. **Virus Reviews and Research**, v. 7, p. 191, 2002. Trabalho apresentado no XIII Encontro Nacional de Virologia, 2002, Águas de Lindóia. São Paulo.

MOYA, A.; ELENA, S. F.; BRACHO, A.; MIRALLES, R.; BARRIO, E. The evolution of RNA viruses: a population genetics view. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 13, p. 6967-6973, 2000.

PARK, S. J.; JEONG, C.; YOON, S. S.; CHOY, H. E.; SAIF, L. J.; PARK, S. H.; KIM, Y. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; LEE, B. J.; CHO, H. S.; KIM, S. K.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Detection and characterization of Bovine Coronaviruses in fecal specimens of adult cattle diarrhea during the warmer seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3178-3188, 2006.

PRATELLI, A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. **Veterinary Research**, v. 37, p. 191-200, 2006.

PENSAERT, M.; CALLEBAUT, P.; COX, E. Enteric coronaviruses of animals In: KAPIKIAN, A. Z. **Viral infections of the gastrointestinal tract**. 2. ed. New York: Marcel-Dekker, 1994. p. 627-696.

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.

ROTTIER, P. J. M. The molecular dynamics of feline coronaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.69, p.117-125, 1999.

SAEKI, K.; OHTSUKA, N.; TAGUCHI, F. Identification of the spike protein residues of murine coronavirus responsible for receptor-binding activity by use of soluble receptor-resistant mutants. **Journal of Virology**, v. 71, n. 12, p. 9024-9031, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Protocol 1- the basic polymerase chain reaction. In: SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. (Ed). **Molecular cloning: a laboratory manual**. [S.l.]: CSHL Press, 1996. v. 2. p. 8.23.

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.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; SANDRI, T. L.; BARROS, I. N.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. Differentiation of Bovine Coronavirus (BCoV) genotypes by a restriction enzyme. **Biológico**, v. 70, n. 2, p. 121, 2008a. Trabalho apresentado na XXI Reunião Anual do Instituto Biológico, 2008.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; VILLARREAL, L. Y. B.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDÃO, P. E. A semi-nested assay targeted to Coronavirus Bovine hemagglutinin-esterase gene as a basis for molecular epidemiology. **Virus Reviews and Research**, v. 13, p. 119, 2008b. Trabalho apresentado no XIII Encontro Nacional de Virologia, 2008, Caxambu.

SUNGWHAN, A.; MAEDA, A.; MAKINO, S. Coronavirus transcription early in infection. **Journal of Virology**, v. 72, n. 11, p. 8517-8524, 1998.

SWOFFORD, D. L. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2000. 1 CD-ROM.

TAGUCHI, F. The S2 subunit of the murine coronavirus spike protein is not involved in receptor binding. **Journal of Virology**, v. 69, n. 11, p. 7260-7263, 1995.

TAKIUCHI, E.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Molecular analysis of the ovine coronavirus S1 gene by direct sequencing of diarrheic fecal specimens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 277-282, 2008.

TAKIUCHI, E.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. **Journal Virological of Methods**, v. 131, p. 148-154, 2006.

TEGTMEIER, C. ; UTTENTHALL, A. A. ; FRIIS, N. S. ; JENSEN, N. E. ; JENSEN, H. E. Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 46, p. 693-700, 1999.

TOTH, T. E. Trypsin-enhanced replication of neonatal calf diarrhea coronavirus in bovine embryonic lung cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n. 6, p. 967-972, 1982.

TSUNEMITSU, H.; YONEMICHI, H.; HIRAI, T.; KUDO, T.; ONOE, S.; MORI, K.; SHIMIZU, M. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 53, n. 3, p. 433-437, 1991.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B. ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses. In: **The Seventh Report of the INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES**. San Diego: Academic Press, 2000.

VIJGEN, L.; KEYAERTS, E.; LEMEY, P.; MAES, P.; VAN REETH, K.; NAUWYNCK, H.; PENSART, M.; VAN RANST, M. Evolutionary history of the closely related group 2 coronaviruses: porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus, bovine coronavirus, and human coronavirus OC43. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 7270-7274, 2006.

VILLARREAL, L. Y. B.; BRANDÃO, P. E.; JEREZ, J. A.; FERREIRA, A. J. P. A universal polymerase chain reaction to Group 2 coronaviruses targeted to the hemagglutinin-esterase gene. **Virus Reviews and Research**, v. 9, p. 101, 2004. Trabalho apresentado no XV Encontro Nacional de Virologia, São Pedro.

YAMADA, Y. K.; TAKIMOTO, K.; YABE, M.; TAGUCHI, F. Acquired fusion activity of a murine coronavirus MHV-2 variant with mutations in the proteolytic cleavage site and the signal sequence of the S protein. **Virology**, v. 227, p. 215-219, 1997.

ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A. V. Uma análise conjuntural da produção de leite brasileira. Disponível em: <http://www.milknet.com.br/?pg=materia&id=81&local=>. Acesso em: 01/12/08.