SABRINA SONZA

**Disenteria de Inverno: Detecção de coronavírus
bovino (BCoV) por reação de PCR dirigida ao gene
Rp Rd e isolamento em cultivo celular de HRT-18G**

São Paulo

2006

SABRINA SONZA

**Disenteria de Inverno: Detecção de coronavírus
bovino (BCoV) por reação de PCR dirigida ao gene
Rp Rd e isolamento em cultivo celular de HRT-18G**

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e 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 e Aplicada à Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Jerez

**São Paulo
2006**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1828
FMVZ

Sonza, Sabrina

Disenteria de inverno: detecção de coronavírus bovino (BCoV) por reação de PCR dirigida ao gene Rp Rd e isolamento em cultivo celular de HRT-18 / Sabrina Sonza. – São Paulo : Sabrina Sonza, 2006.
43 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Patologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez

1. Disenteria de Inverno. 2. Coronavirose. 3. Isolamento. 4. PCR
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Disenteria de inverno: detecção e diversidade molecular pela análise da amplificação dos segmentos genômicos do ectodomínio S₁ da proteína estrutural S ("spike")" protocolo nº523/2004, utilizando amostras fecais, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Jerez, 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 "ad referendum".

(We certify that the Research "Winter dysentery: detection and molecular diversity by amplification and analysis of S₁ ectodomain from structural protein S₁ (spike). ", protocol number 523/2004, utilizing fecal samples, under the responsibility of Prof. Dr. José Antonio Jerez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 21 de setembro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SONZA, Sabrina

Título: Disenteria de Inverno: Detecção de coronavírus bovino (BCoV) por reação de PCR dirigida ao gene Rp Rd e isolamento em cultivo celular de HRT-18G

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para 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 Pais,
que sempre estiveram ao meu lado,
a um novo velho amor,
que me trouxe paz,
e a Deus,
que sempre iluminou meu caminho.

dedico.

Ao Prof. Dr. José Antonio Jerez, pela confiança, amizade e exemplo de ética universitária e de ser humano.

Ao Prof. Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos, pelo empenho na condução do curso de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada as Zoonoses.

A Prof^a. Dr^a. Andréa Micke Moreno, pela disponibilização do Laboratório de Suínos (VPS-USP) para a elaboração de parte deste trabalho.

A Prof. Dr. Antonio Piantino e Claudete Serrano Alstolfi Ferreira, pela disponibilização e acolhimento no Laboratório de Ornitopatologia (VPT-USP) para a elaboração de grande parte deste trabalho.

A Sra. Elza Faquim, supervisora técnica da biblioteca da FMVZ da USP, pela enorme ajuda, carinho e amizade que fez com que este trabalho pudesse ser entregue a tempo.

Ao Paulo Eduardo Brandão, Laura Yaneth Villarreal Buitrago, pela colaboração direta a cada passo e pelo companheirismo constante ao longo de todos os dias destes últimos anos.

Ao Fabio Gregori, Jorge Chacon, Antonio Carlos Pedroso, Carina Nishio, Amarílis Novaes, Marcelo Pequini, Gabriela Uliana e todos os colegas do laboratório de Ornitopatologia pela ajuda, amizade e incentivo.

Ao Alexandre Abelardo Sanches, pela sua dedicação, eficiência, ajuda e apoio nestes anos de aprendizado.

Ao Dr Ângelo Jorge Sforsin, Médico Veterinário autônomo de Itapetininga e Dr Pedro Soares Bezerra Junior, pela ajuda na colheita de amostras e contatos com produtores rurais.

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

A todos os pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ, pelo aprendizado e momentos de descontração.

Agradeço.

RESUMO

SONZA S. **Disenteria de inverno:** detecção de coronavírus bovino (BCoV) por reação de PCR dirigida ao gene Rp Rd e isolamento em cultivo celular de HRT-18G. [**Winter Dysentery:** Detection of bovine coronavirus (BCoV) by RT-PCR for the Rp Rd gene and isolation in monolayers of HRT-18G cells]. 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Coronavirus bovino (BCoV), um membro da família *Coronaviridae*, causa severa diarreia em bezerros neonatos e tem sido associado a diarreias de inverno em vacas leiteiras em vários países, incluindo o Brasil. A morbidade da disenteria de inverno é alta chegando até 100% , sendo um fator importante para economia já que causa queda da produção leiteira, levando a grandes perdas as criações de vacas leiteiras. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a ocorrência de BCoV em vacas, diagnosticando amostras positivas por RT-PCR gene Rp Rd e isolando estas amostras positivas em células da linhagem HRT-18G. As amostras de fecais foram obtidas de 43 vacas leiteiras com disenteria de 8 propriedades dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil. Das dez (10/43=23%) amostras positivas para esta técnica, 7 foram inoculadas em células da linhagem HRT-18G, sendo que o isolamento foi comprovado pela mesma técnica após seis passagens seriadas em 4 inoculações. Com isso, mostra-se que o BCoV também está envolvido em disenterias de inverno em vacas leiteiras no Brasil. E através de isolamentos deste vírus, podemos contribuir para estudos continuados ajudar no esclarecimento de sua epidemiologia e possibilitar com um banco de vírus a prevenção de ordem também específica da enfermidade.

Palavra-chave: Disenteria de inverno. Coronavirose. Isolamento. PCR.

ABSTRACT

SONZA S. **Winter dysentery:** detection of bovine coronavirus (BCoV) by RT-PCR for the Rp Rd gene and isolation in monolayers of HRT-18G cells. [Disenteria de inverno: detecção de coronavírus bovino (BCoV) por reação de PCR dirigida ao gene Rp Rd e isolamento em cultivo celular de HRT-18G]. 2006. 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Bovine coronavirus (BCoV), a member of *Coronaviridae* family, causes severe diarrhea in newborn calves and has been associated with outbreaks of winter dysentery (WD) in adult cattle in several countries, including Brazil. The morbidity rate of WD is very high (50-100%) and the disease causes severe economic losses once it decreases milk production. The aim of the present study was to survey for the occurrence of BCoV in cows using a RT-PCR targeted to the replicase gene and to isolate positive samples in HRT-18G cells. The fecal samples were obtained from 43 adult dairy cows with dysentery from São Paulo and Minas Gerais States, Brazil. Ten (23%) of the 43 fecal samples were positive for BCoV and 7 of these were inoculated in HRT-18G cells, when the isolation of 4 samples was proved by RT-PCR after sex passages. These findings indicate that BCoV is also involved in outbreaks of dysentery in adult cattle in Brazil. This shows the importance of more comprehensive studies on coronavirus in dairy cattle in the surveyed area and, with the isolation of the virus strains studied herein, one may contribute to other studies to enlighten the epidemiology and prevention of the disease.

Key-words: Winter dysentery. Coronavirus. Isolation. PCR.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µL	microlitro
apud	citado por
°C	graus Celsius
DEPC	dietil-piro-carbonato
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNAc	ácido desoxirribonucléico complementar
dNTP	base nitrogenada (A,G,T,ou C)
et al.	e colaboradores
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EDTA	ácido etileno-di-amino-tetra-acético
g	aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)
M	molar
Ma	miliamper
Mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
min	minuto
MgCL ₂	cloreto de magnésio
pM	picomolar
N	normal
nm	nanômetro
PBS	solução tampão fosfato
PCR	reação em cadeia pela polimerase
p/v	peso/volume
pH	concentração de hidrogênio iônico
RNA	ácido ribonucléico
RT	transcrição reversa
s	segundo
U	unidade internacional
v/cm	volume/centímetro

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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
3	OBJETIVOS	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1	AMOSTRAS FECAIS	21
4.2	AMOSTRA PADRAO DE CORONAVIRUS BOVINO	21
4.3	OLIGONUCLEOTIDEOS INICIADORES	22
4.4	LINHAGEM CELULAR	23
4.5	PREPARO DO MATERIAL FECAL	24
4.6	REACAO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA AMPLIFICACAO E DETECCAO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEINA RNA- POLIMERASE RNA-DEPENDENTE DO BCOV (RT-PCR GENE RP RD)	24
4.6.1	Extração do Acido Nucléico Viral	24
4.6.2	Desnaturação do RNA	25
4.6.3	Transcrição Reversa	25
4.6.4	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	25
4.6.5	Nested-PCR	26
4.7	ISOLAMENTO EM CULTURA DE CELULAS	26
4.7.1	Cultura de Células em Monocamada	27
4.7.2	Inoculação	28
5	RESULTADOS	29
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A disenteria de inverno é uma enfermidade que acomete o gado bovino leiteiro e de corte e já foi relatada em vários países da Europa, da América do Norte, da Ásia, na Austrália e em Israel, acarretando graves prejuízos à exploração econômica racional, seja pela queda da produção leiteira, ou perda de peso e custos com tratamentos (COOKINGHAM, 1978; AKASHI et al., 1980; ESPINASSE, et. al., 1982; BROES et al., 1984; CAMPBELL; DURHAM, et al., 1989; TRAVÉN, 2001; JEONJ et al., 2005).

No Brasil, o primeiro relato de disenteria de inverno em vacas leiteiras foi feito por Brandão et al. (2002), em um surto de diarreia ocorrido em uma propriedade de criação de bovino leiteiro localizada no Estado de São Paulo.

Apesar disso, ainda são poucos os estudos desta enfermidade no Brasil, dada à importância econômica que pode representar para o país. Assim, métodos de diagnóstico laboratorial, rápidos e seguros, para se detectar o coronavírus bovino (BCoV) envolvido na sua etiologia devem se constituir no ponto de partida para o estudo da distribuição e prevalência da enfermidade.

Ao lado disso, informações acerca das variações antigênicas do BCoV são fundamentais na epidemiologia da doença, principalmente no que diz respeito à adoção de medidas profiláticas de ordem específica.

A reação de RT-PCR gene Rp Rd e o isolamento de BCoV em cultura de células da linhagem HRT-18G poderão abrir novas perspectivas de pesquisa continuada na disenteria de inverno, detectando a presença do agente etiológico a partir de material fecal e a formação de um banco de amostras, visando à aplicação de metodologias moleculares que possam fornecer informações genotípicas e antigênicas das mesmas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

As coronaviroses são de distribuição mundial e acomete os sistemas respiratório, digestivo, reprodutivo, nervoso, linfático e urinário de diversas espécies de aves e mamíferos, inclusive o homem (LAI; HOLMES, 2001; ICTV, 2006).

A primeira enfermidade ligada ao coronavírus foi à bronquite infecciosa das galinhas, em um surto de enfermidade respiratória aguda e fatal que acometeu galinhas jovens no Estado de Dakota do Norte (SCHALK et al., 1931).

O interesse pelos coronavírus aumentou consideravelmente a partir de 2003, quando se verificou a sua participação na etiologia de um processo respiratório agudo com alta mortalidade (SARS = síndrome respiratória aguda grave) em humanos. Após muitas controvérsias quanto às origens e classificação, atualmente está incluída entre os coronavírus do grupo 2 (KSIAZEK et al., 2003; REST; MINDELL, 2003; ICTV, 2006; MASTERS, 2006).

Em bovinos, os coronavírus (BCoV) (Figura 1) foram detectados pela primeira vez por Stair et al. (1972), a partir de material fecal de bezerros com diarreia, proveniente de vários surtos de neonatal, em diversas propriedades de criação de gado bovino leiteiro localizadas no Estado de Nebraska. Posteriormente, foram detectados como agente etiológico da disenteria de inverno das vacas adultas, que tem grande importância econômica, uma vez que na fase aguda da doença pode haver queda de até 90% na produção leiteira das vacas em lactação (TAKAHASHI et al., 1980; ESPINASSE et al., 1982). As duas formas (diarreia neonatal e disenteria de inverno das vacas adultas) já foram assinaladas no Estado de São Paulo (BRANDÃO et al., 2002; JEREZ et al., 2002).

Fonte: gentilmente cedida pelo Prof. Stewart McNulty. Disponível: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/WIntkey/Images/vsd14_c.jpg Acesso 29 abr. 2006.

Figura 1 - Fotomicrografia eletrônica de amostra contendo partículas virais de coronavírus

Os coronavírus estão classificados na ordem *Nidovirales* e família *Coronaviridae*, que compreende os gêneros *Coronavírus* e *Torovirus*. O gênero *Coronavírus* está subdividido em três grupos (Quadro 1), de conformidade com os epitopos presentes nas glicoproteínas de envelope, as seqüências de nucleotídeos e a predileção por hospedeiros naturais (VAN REGENMORTEL et al., 2000; GONZÁLEZ et al., 2003; ICTV, 2006).

GRUPO I		GRUPO II	
TGEV	VÍRUS DA GASTROENTERITE TRANSMISSÍVEL DOS SUÍNOS	BCoV	CORONAVÍRUS BOVINO
FIPV	VÍRUS DA PERITONITE INFECCIOSA FELINA	HCoV-OC43	CORONAVÍRUS HUMANO OC-43
FCoV	CORONAVÍRUS ENTÉRICO FELINO	HECoV-4408	CORONAVÍRUS ENTÉRICO HUMANO 4408
CCoV	CORONAVÍRUS CANINO	HEV	VÍRUS HEMAGLUTINANTE DA ENCEFALOMIELE SUÍNA
HCoV-229 E	CORONAVÍRUS HUMANO 229 E	MHV	VÍRUS DA HEPATITE MURINA
BAT-CoV	CORONAVÍRUS DE MORCEGOS	RtCoV	CORONAVÍRUS DE RATOS
HCoV-NL63	CORONAVÍRUS HUMANO NL63	EqCoV	CORONAVÍRUS EQUÍNO
PRCoV	CORONAVÍRUS RESPIRATÓRIO SUÍNO	CRCoV	CORONAVÍRUS RESPIRATÓRIO CANINO
PEDV	VÍRUS DA DIARRÉIA SUÍNA EPIDÊMICA	PV	VÍRUS DA PUFINOSE
GRUPO III		SDAV	VÍRUS DA SIALODACRIOADENITE
IBV	VÍRUS DA BRONQUITE INFECCIOSA	HCoV-SARS	CORONAVÍRUS DA SARS
PhCoV	CORONAVÍRUS DE FAISÕES		
TCoV	CORONAVÍRUS DE PERUS		

Fonte: Adaptado de Brandão et al., 2001; Ksiazek et al., 2003; Masters, P. S., 2006.

Quadro 1 - coronavírus: hospedeiros naturais, doenças por eles causadas, grupos e subdivisão em grupos

A morfologia predominante deste vírus é esférica, com aproximadamente 100 a 160 nm de diâmetro, todavia são bastante pleomórficos devido a presença de envelope, que é constituído por dupla camada de lipídeos. A denominação coronavírus deve-se as projeções que emergem do envelope e dão à partícula viral o aspecto sugestivo de coroa (latim: *corona* = coroa) (Figura 2). O capsídeo tem simetria helicoidal com predomínio da fosfoproteína N (nucleocapsídeo), que envolve o genoma viral, formado por RNA de fita simples (ssRNA), não segmentado, de polaridade positiva, com 32 kpb e 6,8 kdaltons. As principais propriedades ligadas a infectividade, virulência e variabilidade estão associadas às proteínas de envelope (Figura 2). O BCoV pertence ao grupo 2 e esta sorologicamente ligado ao coronavírus humano HCoV-OC43 (VANREGENMORTEL et al., LAI, 1996; LAI; CAVANAGH, 1997; 2000; HOLMES; BRANDAO et al., 2001; GONZALEZ et al., 2003; KSIAZEK et al., 2003; ICTV, 2006).

As principais propriedades ligadas a infectividade, virulência e variabilidade estão ligadas às proteínas de envelope, que são proteínas de classe I, isto é, tem um domínio citoplasmático, um domínio de transmembrana e um domínio extracelular (LAI; CAVANAGH, 1997; BRANDÃO et al., 2001).

S = PROTEÍNA DE ESPÍCULA
M = PROTEÍNA DE MEMBRANA
sM (E) = PEQUENA PROTEÍNA DE MEMBRANA
HE = HEMAGLUTININA-ESTERASE
N = NUCLEOPROTEÍNA

Fonte: Brandão et al., 2001

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura de uma partícula viral de coronavírus, com destaque às proteínas e suas localizações

A proteína M (matriz) tem 221 a 262 aminoácidos e 25-30 kda. Desempenha função importante na montagem da partícula viral, formando a estrutura do envelope; é uma proteína de baixa variabilidade e a ocorrência de mutações não leva as alterações na patogenicidade e no tropismo por tecidos (CLARK, 1993; LAI; CAVANAGH, 1997; YAMADA et al., 2000; VABRET et al., 2001).

Em conjunto com a proteína M, temos a sM (“Small membrane protein”), composta de 84 a 109 aminoácidos e 8,4-12 kda, também essencial à estrutura do envelope (LIU; INGLIS, 1991; SIDDELL, 1995).

Os coronavírus do grupo 2 apresentam uma proteína acessória de envelope, exclusiva do grupo, denominada de hemaglutinina-esterase (HE), com

aproximadamente 65 kda, encontrada sob a forma de dímeros. Apesar de sua denominação, a proteína HE tem uma atividade hemaglutinante fraca quando comparada à proteína S. Age como um cofator da proteína S, apresentando uma atividade de enzima destruidora de receptores (esterase), que cliva o resíduo 9-O-acetil de ácidos siálicos e guarda similaridade com a proteína HE dos vírus da influenza C (BRIAN, 1985; KING; POTTS; SCHULTZE et al., 1991; CLARK, 1993; CORNELISSEN et al., 1997).

A mais proeminente proteína estrutural do envelope dos coronavírus é a proteína S (“spike”); são projeções de cerca de 20nm de comprimento, responsáveis pela aparência espiculada do vírion, pela adsorção do vírus aos receptores da célula do hospedeiro, pela atividade hemaglutinante e pela indução de anticorpos neutralizantes. É a proteína mais polimórfica entre os coronavírus. Organizada em fora de dímeros ou trímeros, sua mutação pode interferir no tropismo e infectividade dos coronavírus. A proteína completa tem 180 kda, 1363 aminoácidos e em alguns vírus, como o BCoV, é clivável nas subunidades S1 e S2, com 90 kda cada (COLLINS et al., 1982; CAVANAGH, 1995).

A subunidade S2 e a porção carboxi-terminal da proteína e forma a haste da espícula, responsável pela fusão de membrana e formação de sincícios; em função de não apresentar domínios hidrofóbicos, não está envolvida na ligação aos receptores celulares (LAI; CAVANAGH, 1997).

A subunidade S1 e a porção amino-terminal da proteína e forma o bulbo da espícula, sendo a responsável pela ligação aos receptores celulares, pela atividade hemaglutinante e contém a maior parte dos sítios antigênicos. A região compreendida entre os aminoácidos 33 a 40 é o ectodominio mais exposto às pressões seletivas imunológicas e, conseqüentemente, a um polimorfismo bem mais acentuado de que todas as demais proteínas estruturais (ABRAHAM et al., 1990; LAI; CAVANAGH, 1997; BRANDAO et al., 2001; BRANDAO et al., 2006).

A mais importante proteína não-estrutural dos coronavírus é a RNA-replicase ou polimerase-RNA-dependente (Rp Rd). A organização estrutural do genoma dos coronavírus (Figura 3) apresentam múltiplas ORFs (open reading frame) na sequência 5' guanina – 3' citosina. Os segmentos genômicos que codificam as principais proteínas estruturais ocupam menos de um terço da porção terminal 3', enquanto que o segmento genômico que codifica a Rp Rd ocupa dois terços da porção 5', compreendida pelas ORF1a e ORF1b (Figura 3). Trata-se de uma poliproteína de

740-800kda, co-traducionalmente processada, que é a responsável pela transcrição e pela replicação virais, sendo altamente conservada entre os coronavírus, mesmo em se tratando de espécies de grupos diferentes (STEPHENSEN; CASEBOLT; GANGOPADHYAY, 1999; MASTERS, 2006).

Fonte: Masters, P. S., 2006

Figura 3 - Organização genômica da sequência 5' guanidina 3' citosina dos coronavírus: a ordem invariável de replicação é 5' - Rp Rd- 2^a- HE-S- 4- 5a- E- M-N-3'

O conhecimento das proteínas e dos seus genes codificadores é fundamental para o desenvolvimento de metodologias de diagnóstico laboratorial e na melhor compreensão da cadeia epidemiológica das coronaviroses. Tanto na diarreia neonatal, como na disenteria de inverno o diagnóstico clínico é praticamente impossível, uma vez que os sinais não são patognomônicos. Assim sendo, somente o diagnóstico laboratorial pode fornecer dados concretos acerca da participação de BCoV na etiologia dos processos. O diagnóstico laboratorial das coronaviroses iniciou-se com a microscopia eletrônica de coloração negativa. Pelo alto grau de polimorfismo das partículas virais, a introdução da imunomicroscopia eletrônica, com a utilização de anticorpos específicos para agregação das partículas virais, aumentou a segurança no diagnóstico. Além do alto custo da implantação inicial, a grande limitação de ambas é o tempo necessário para o processamento de amostras, principalmente em casos de surtos, sem falar na necessidade de pessoal treinado (DEA; ROY; BETIN, 1979; REYNOLDS et al., 1984; TRAVEN, 2001).

No decorrer do tempo, várias metodologias foram sendo desenvolvidas e utilizadas: imunofluorescência em fragmentos de alças intestinais, hemaglutinação/inibição da hemaglutinação – HA/HI, contraímunoelctroforese,

hemaglutinação passiva reversa e ensaio imunoenzimático (MEBUS; NEWMAN; STAIR, 1975; SATO et al., 1977; DEA; ROY; BETIN, 1979; SATO; AKASHI, 1993; REYNOLDS et al., 1984; SATO et al., 1984; JEREZ et al., 2002).

O maior obstáculo à aplicação de reações sorológicas para a detecção de BCoV a partir de material fecal é a reatividade inespecífica, uma vez que a preservação da integridade da partícula viral, durante o processo de purificação para o preparo de soro hiperimune pode ser compreendida (BRANDÃO et al., 2005).

Outra dificuldade relevante é a produção de BCoV em volume e título adequados ao processo de purificação. O cultivo de BCoV em cultura de células requer várias passagens seriadas para isolamento. A linhagem HmLu-1 (pulmão de hamster) mostrou-se bastante permissiva ao isolamento de amostras de campo de BCoV, todavia a baixa intensidade na replicação viral dificultou a confirmação do isolamento por soroneutralização (JEREZ et al., 2005). A linhagem HRT-18G (tumor retal humano) vem sendo a mais utilizada para o isolamento de amostras de BCoV de origem entérica e respiratória (BENFIELD; SAIF, 1990; TSUNEMITSU et al., 1991).

Apesar de se tratar de uma metodologia bastante laboriosa para a aplicação ao diagnóstico laboratorial, o isolamento de BCoV em cultura de células é um procedimento muito importante para se proporcionar a formação de um banco amostras, visando a caracterização das mesmas (TRAVER, 2000; BRANDÃO et al., 2001).

Dada as limitações das metodologias convencionais, foram desenvolvidas metodologias de biologia molecular, baseadas na reação em cadeia pela polimerase, com o intuito de diagnóstico e tipificação dos coronavírus. Sendo a proteína S a mais importante proteína estrutural, volta-se para ela as principais atenções quanto aos oligonucleotídeos iniciadores, principalmente os dirigidos para o ectodomínio S1 (BRANDÃO et al., 2002; HASOKSUZ et al., 2002; BRANDÃO et al., 2006).

No entanto, se a detecção de BCoV a partir de material fecal for tentada para a sequência de nucleotídeos codificadores do gene S poderá haver resultados falso-negativos, pois poderá não ocorrer a hibridização com esses segmentos. A abordagem mais interessante para a utilização de PCR como metodologia de diagnóstico direto dos BCoV é a escolha de uma região com alta identidade entre as diversas espécies de coronavírus. Com esse intuito foram desenvolvidos oligonucleotídeos iniciadores dirigidos para a sequência de nucleotídeos do gene

codificador da proteína M (VERBEEK; TIJSEN, 1990; PRATELLI et al., 2000). Para aprimorar a eficiência no diagnóstico, sempre buscando uma região do genoma viral que seja altamente conservada e com alta identidade para todas, ou pelo menos para a maioria das amostras possíveis, oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de segmentos do gene codificador da RNA-polimerase-RNA-dependente (gene Rp Rd) parece ser uma abordagem das mais interessantes, uma vez que se trata de uma região de alta identidade entre diversas espécies de coronavírus (CASEBOLT; BIAO; STEPHENSEN, 1997; STEPHENSEN; CASEBOLT; GANGOPADHYAT, 1999; BRANDÃO et al., 2005).

3 OBJETIVOS

- Detectar a presença de coronavírus bovino (BCoV) a partir de amostras fecais diarréicas e/ou disentéricas, de vacas ou novilhas com suspeita clínica de disenteria de inverno, provenientes de fazendas produtoras de leite, localizadas em municípios dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, utilizando-se a reação em cadeia pela polimerase dirigida ao gene Rp Rd (RT-PCR gene Rp Rd).
- A partir das amostras positivas para RT-PCR gene Rp Rd, isolar os BCoV em monocamada de cultura de células da linhagem HRT-18G (tumor retal humano).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foram estabelecidos contatos com médicos veterinários atuantes em propriedades de exploração de bovinos de leite e com os proprietários destas, por meio de telefone, fax e de visitas com o intuito de expor o presente trabalho e conseguir amostras para o mesmo.

Foram incluídas 08 propriedades, sendo 05 localizadas em municípios no Estado de São Paulo, 02 no Estado de Minas Gerais e 01 no Estado do Mato Grosso do Sul; não se fez distinção entre as categorias de produção leiteira (leite do tipo A, B ou C), raças de bovinos criadas, tamanho das propriedades ou área de localização das mesmas. Dado o fato de que os casos de disenteria de inverno ocorrerem em maior frequência no período de inverno, as colheitas de fezes também se concentraram neste período. Tomando-se por definição de caso, vacas ou novilhas apresentando defecação líquida, com eliminação de muco, fragmentos de tecido entérico, coágulos ou estrias de sangue no momento da colheita, o número total de amostras colhidas foi 43.

4.1 AMOSTRAS DE FEZES

As amostras foram colhidas com auxílio de sacos plásticos, diretamente do reto e transportadas sob refrigeração até o Laboratório de Virologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Universidade de São Paulo (USP).

4.2 AMOSTRA PADRÃO DE CORONAVÍRUS BOVINO

Foi utilizada a amostra Kakegawa de coronavírus bovino (BCoV), adaptada ao cultivo em monocamada de cultura de células da linhagem HmLu-1, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Takeo Sakai do Departamento de Preventive Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences and Animal Health, Nihon University, Japão.

4.3 OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

Foram utilizados 02 pares de oligonucleotídeos iniciadores (“primers”): 01 par mais interno – 2BP e 4BM – descrito por Stephensen et al. (1999), para a amplificação de um segmento de 251 pb e 01 par mais externo – CV2L e CV2U – descrito por Brandão et al. (2005), para a amplificação de um segmento de 136 pb (Quadro 2). O segmento de 136 pb amplificado (Figura 4) é o gene codificador da RNA-polimerase-RNA-dependente (gene Rp Rd) dos coronavírus, localizado na ORF1b, altamente conservada entre os BCoV, coronavírus humano OC-43, coronavírus da encefalite hemaglutinante dos leitões e sialocriadenite (STEPHENSEN et. al., 1999; BRANDÃO et al., 2005).

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

Fonte: Stephensen et al (1999) e Brandão et al (2005).

Quadros 2 – Pares de “primers” utilizados para a amplificação do gene codificador da proteína RNA-polimerase-RNA-dependente (gene Rp Rd)

Fonte: adaptação de Lai; Canavanagh (1997).

Figura 4 – Representação esquemática do genoma do BCoV e das regiões amplificadas pela RT-PCR gene Rp Rd (primers 2Bp + 4Bm e CV2U + CV2L)

4.4 LINHAGEM CELULAR

Monocamada de células da linhagem celular HRT-18G (Human rectal tumor) ATCC № CRL-11663, adquirida do Banco de Células do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro e mantida no Laboratório de Virologia do VPS, FMVZ, USP, através de sucessivos repiques em meio de Eagle (MEM- BIOVET®) suplementando com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®).

4.5 PREPARO DO MATERIAL FECAL.

As amostras de material fecal (Item 4.1) foram preparadas como suspensões a 20% em PBS 0,01M/BSA 0,1% e pH 7,2, agitadas em “vortex” e centrifugadas a 12000g durante 30 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C. Decorrido esse período de tempo, o sobrenadante foi recolhido para ser utilizado na reação em cadeia pela polimerase e para isolamento de BCoV em cultura de células.

4.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE PARA AMPLIFICAÇÃO E DETECÇÃO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA RNA-POLIMERASE RNA-DEPENDENTE DO BCoV (RT-PCR GENE RP RD)

Foram utilizados os procedimentos preconizados por Brandão et al. (2005).

4.6.1 Extração do ácido nucléico viral

A extração do RNA das partículas virais porventura presentes nas amostras fecais foi realizado a partir do sobrenadante da suspensão fecal (Item 4.5) pelo método do TRIzol Invitrogen™, de conformidade com as especificações do fabricante:

Em um eppendorf adicionou-se 750 µL de Trizol e 250 µL do sobrenadante da suspensão, agitou-se e incubou-se em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida colocou-se 200 µL de clorofórmio, agitando e incubando-se por 15 min. em temperatura ambiente. Centrifugou-se a 12000g por 15 min. a temperatura de 4° C.

Transferiu-se 500 µL do sobrenadante para outro eppendorf, adicionou-se 500 µL de propanol, agitou-se e incubou-se por 10 min. a temperatura de 4° C.

Após este período, centrifugou-se por 15 min. a 12000g durante 15 min. em centrifuga refrigerada a 4° C.

Descartou-se sobrenadante, adicionou-se 1000 μL de etanol 75%, agitando-se o eppendorf. Logo em seguida foi centrifugado por 10 min. a 12000g em centrifuga refrigerada a 4° C.

Descartou-se o sobrenadante, retirando-se todo excesso de etanol. Com 15 μL de água DEPC 0,1%, ressuspendeu-se o “pellet” e logo em seguida foi incubado a 10 min. a seco em temperatura de 56° C.

Decorrido esse tempo, o eppendorf foi acondicionado à temperatura de 4° C até o momento da desnaturação.

4.6.2 Desnaturação do RNA

O RNA extraído foi desnaturado em termociclador a 94° C durante 5 min.

4.6.3 Transcrição reversa

A transcrição reversa ou síntese de cDNA foi realizada em temperatura de 42°C durante 60 min. em um mix contendo 1 x First Stand Buffer (InvitrogenTM), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/ μL de cada primer (2Bp e 4Bm), 7 μL da extração de RNA do sub-item anterior (4.6.1) e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (InvitrogenTM) para uma reação final de 20 μL .

4.6.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A seguir, 5 μL de cDNA assim obtido foram adicionados ao PCR mix (1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/ μL de cada primer (2Bp e 4Bm), 1,5mM MgCl_2 , 25,25 μL de água ultra pura e 1,25U Taq DNA polimerase para uma reação final de 50 μL e submetidos a 6 ciclos de 94°C/ 1 min., 40 °C/ 2 min. e 72

°C/ 1min., 36 ciclos de 94°C/1 min., 50°C/1,5 min. e 72 °C/1 min., seguidos por 72°C/10 min. para a extensão final.

4.6.5 Nested-PCR

Foi realizado com 5 µL do produto da PCR anterior (item 4.6.4) adicionado ao mix contendo 1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada primer CV2L e CV2U, 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL de água ultra pura e 1,25U Taq DNA polymerase e submetidos a 26 ciclos de 94° C/ 1 min., 54,8 °C/ 1,5 min. e 72 °C/ 1 min. seguidos por 72° C/ 10 min. para a extensão final. Nesta etapa, foram incluídas amostras de água ultrapura a cada três amostras para se avaliarem contaminações por DNA amplificado.

Após a segunda amplificação, 10 µL deste produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão TBE (TRIS-HCl 0,089 M em pH 8,3, ácido bórico 0,089 M e EDTA 2mM) em voltagem adequada à dimensão do gel (1-10 V/cm), seguindo-se coloração com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL. Foram consideradas positivas as amostras que produziram uma banda correspondente ao segmento de 136 pares de bases.

Como controle negativo foi utilizado PBS 0,01M/BSA1% pH 7,2 e como controle positivo à amostra Kakegawa.

Cada etapa (extração de RNA, transcrição reversa, PCR, nested-PCR e eletroforese) foi realizada em ambientes separados, com o intuito de se evitarem contaminações entre as amostras.

4.7 ISOLAMENTO EM CULTURA DE CÉLULAS

Dentre as amostras positivas na RT-PCR gene Rp Rd, foram escolhidas ao acaso 07 delas para a tentativa de isolamento de BCoV em monocamada de células da linhagem HRT-18G.

4.7.1 Cultura de células em monocamada

As monocamadas de cultura de células foram preparadas de conformidade com o seguinte protocolo:

- 1- o meio de crescimento foi desprezado do conteúdo da garrafa pelo lado oposto ao da monocamada de células em um recipiente apropriado;
- 2- a monocamada foi lavada com PBS pH 7.2;
- 3- foi adicionado 3 mL de uma solução de tripsina/versene e aguardado 3 minutos;
- 4- a solução de tripsina/versene foi descartada, deixando-se restar um resíduo de cerca de 1 mL;
- 5- a garrafa foi mantida em estufa a 37°C durante 15 minutos, colocando-se a face da garrafa que contém a monocamada voltada para cima;
- 6- foi observado o descolamento da monocamada com a agitação da garrafa;
- 7- foi adicionado meio de crescimento [meio mínimo de Eagle (MEM-BIOVET®), com 10% de soro fetal bovino (Cultilab®)], lavando-se várias vezes a superfície interna da garrafa;
- 8- uma vez homogeneizadas as células no meio de crescimento, o conteúdo foi igualmente dividido e distribuído em 03 garrafas novas;
- 9- o volume foi completado com meio de crescimento para 13 mL;
- 10- as garrafas foram arrolhadas, identificadas e levadas à estufa a 37 °C, acompanhando-se o desenvolvimento da monocamada por meio de um microscópio óptico invertido.

4.7.2 Inoculação

Utilizaram-se os procedimentos preconizados por Jerez et al. (2005), com algumas modificações.

O sobrenadante da suspensão das amostra fecal (preparado de conformidade com o item 4.5) foi filtrado em unidades filtrantes MILEX-MILLIPORE® de 0,22 µm de porosidade.

O meio de crescimento das monocamadas foi desprezado, a monocamada lavada com PBS 0,01 M pH 7.2 e 1 mL da suspensão fecal filtrada foi adicionada.

As garrafas foram levadas para estufa a 37° C durante 1 hora, com agitações periódicas, para adsorção vírus-célula.

Decorrido esse período, o inóculo foi dispensado e, a seguir, foi adicionado 10 mL de meio de manutenção (MEM BIOVET® com 2% de soro fetal bovino CULTILAB®) e as garrafas foram incubadas em estufa a 37°C e o acompanhamento de alteração na monocamada foi feito por meio de um microscópio óptico invertido.

Foram realizadas até seis passagens seriadas para que se observasse o aparecimento de efeito citopático característico. Uma vez observado o efeito citopático sincicial, ou tendo sido completado um período de até 14 dias após a inoculação, as garrafas foram congeladas a -20°C.

Para as passagens seriadas tomou-se 2mL da passagem anterior e repetiram-se os mesmos procedimentos acima descritos.

A confirmação do isolamento de BCoV em amostras que apresentaram efeito citopático sincicial foi realizada pela reação em cadeia pela polimerase dirigida ao gene codificador da RNA-polimerase-RNA-dependente (RT-PCR gene Rp Rd), seguindo-se os mesmos procedimentos do item 4.6.

Como controle negativo usou-se PBS 0,01M/BSA1% e pH 7,2; como controle positivo foi usada uma amostra de campo previamente isolada no Laboratório de Virologia do VPS da FMVZ da USP.

5 RESULTADOS

Dentre as 43 amostras de material fecal diarréico e/ou disentérico, 10 foram positivas para a detecção de BCoV por meio de RT-PCR gene Rp Rd uma vez que pode ser verificada a amplificação correspondente ao seguimento de 136 pb responsável pela codificação da proteína RNA-polimerase-RNA-dependente (Figura 5), resultando, assim, em uma frequência de 23% ($10/43=23\%$) de casos positivos para a disenteria de inverno em animais das propriedades estudadas.

Figura 5 - Gel de agarose a 1,5 %, corado com brometo de etídio a 0,5 µg/mL, demonstrando a amplificação por meio da reação de RT-PCR gene Rp Rd do segmento de 136 pb do BCoV, a partir de duas amostras de material fecal positivo (canaletas 7 e 11), controles positivo e negativo da reação (canaletas 2 e 13 respectivamente) e controle de nested (canaleta 14). Canaleta 1: padrão de peso molecular ("ladder"). Demais canaletas: amostras negativas

Dentre as 8 propriedades nas quais as amostras foram colhidas, 3 apresentaram animais com resultados positivo, resultando em uma frequência de 37% (3/8=37%) das propriedades estudadas (Tabela 1).

Como a colheita das amostras concentrou-se nos meses de inverno, maior número de amostras positivas foi detectado no mês de julho.

Dentre as 10 amostras positivas por RT-PCR gene Rp Rd, escolheu-se, ao caso, 7 delas para o isolamento de BCoV em monocamada de células da linhagem HRT-18G. Até a segunda passagem seriada, nenhuma delas evidenciou qualquer alteração na monocamada, que pudesse ser sugestiva de efeito citopático. Na terceira passagem seriada, 4 amostras começaram a apresentar sinais sugestivos de efeito citopático entre cinco e dez dias após a inoculação (Figura 6). Na quarta passagem seriada, 3 delas apresentaram efeito citopático sincicial bem característico e total (CPE⁺⁺⁺) no oitavo dia após a inoculação. Para a outra amostra foram necessárias seis passagens seriadas para que pudesse ser observado esse tipo de efeito citopático no mesmo período de tempo. Todas as 4 amostras foram positivas para a detecção de BCoV por RT-PCR gene Rp Rd. As demais amostras (3), não apresentaram nenhuma modificação perceptível na monocamada até a sexta passagem seriada e foram negativas para a detecção de BCoV (Tabela 2). A amostra controle positivo apresentou efeito citopático do tipo sincicial e total a partir do quarto dia pós-inoculação e a presença de BCoV foi confirmada em todas as passagens.

Tabela 1 - Resultados da reação em cadeia pela polimerase dirigida ao gene codificador da proteína RNA-polimerase-RNA-dependente (RT-PCR gene Rp Rd) para a detecção de BCoV, a partir de material fecal diarreico e/ou disenterico proveniente de vacas ou novilhas, segundo o município de localização das propriedades de criação de gado bovino leiteiro e a data de colheita - São Paulo - 2006

Nº ordem	Identificação	Origem	Data de Colheita	RT-PCR gene Rp Rd
01	PRINCESA	SARAPUÍ	06/05/2004	POSITIVO
02	43C	PARAIBUNA	24/07/2004	NEGATIVO
03	BRÁSILIA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
04	A	LAVRAS	27/07/2004	POSITIVO
05	PAVUWA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
06	ANDORINHA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
07	MOCINHA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
08	FORTUNA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
09	MULATA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
10	ROLINHA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
11	MIMOSA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
12	PINTURA	LAVRAS	27/07/2004	POSITIVO
13	CRIOLA	LAVRAS	27/07/2004	NEGATIVO
14	RAINHA	MOGI DAS CRUZES	01/12/2004	NEGATIVO
15	BALERINA	MOGI DAS CRUZES	01/12/2004	NEGATIVO
16	PRETINHA	MOGI DAS CRUZES	01/12/2004	NEGATIVO
17	44C	SÃO PAULO	05/08/2004	NEGATIVO
18	45C	SÃO PAULO	05/08/2004	NEGATIVO
19	46C	SÃO PAULO	05/08/2004	NEGATIVO
20	47C	SÃO PAULO	05/08/2004	NEGATIVO
21	48C	SÃO PAULO	05/08/2004	NEGATIVO
22	49C	SÃO PAULO	05/08/2004	NEGATIVO
23	50C	SÃO PAULO	05/08/2004	NEGATIVO
24	65C	SÃO PAULO	04/04/2005	NEGATIVO
25	66C	CAMPO GRANDE	04/04/2005	NEGATIVO
26	16	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
27	182	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
28	183	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
29	184	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
30	186	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
31	187	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
32	188	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
33	189	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
34	19º	SÃO J. CAMPOS	05/05/2005	NEGATIVO
35	PAQUITA 2	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	NEGATIVO
36	VACAMARELA	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	POSITIVO
37	ALEGRIA 2	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	NEGATIVO
38	ALEGRIA 1	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	POSITIVO
39	PAQUITA1	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	POSITIVO
40	MIMOSA	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	POSITIVO
41	VACA 2	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	POSITIVO
42	CORUJINHA	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	POSITIVO
43	PRINCESINHA	RIBEIR. VERMELHO	07/07/2005	POSITIVO

Tabela 2 – Alterações observadas em monocamadas de cultura de células da linhagem HRT-18G, até o décimo dia pós-inoculação, para a tentativa de isolamento de BCoV a partir de material fecal de 7 amostras positivas e o resultado da RT-PCR gene Rp Rd para a confirmação do isolamento - São Paulo - 2006

	12	36	38	39	40	42	43	Controle Positivo
1 ^a pas.	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	CPE ⁺⁺⁺
2 ^a pas.	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	NDN	CPE ⁺⁺⁺
3 ^a pas.	NDN	CPE ⁺	NDN	CPE ⁺	NDN	CPE ⁺	CPE ⁺	CPE ⁺⁺⁺
4 ^a pas.	NDN	CPE ⁺	NDN	CPE ⁺⁺⁺	NDN	CPE ⁺⁺⁺	CPE ⁺⁺⁺	CPE ⁺⁺⁺
5 ^a pas.	NDN	CPE ⁺⁺	NDN	-	NDN	-	-	CPE ⁺⁺⁺
6 ^a pas.	NDN	CPE ⁺⁺⁺	NDN	-	NDN	-	-	CPE ⁺⁺⁺
RT-PCR	NEGAT.	POSIT.	NEGAT.	POSIT.	NEGAT.	POSIT.	POSIT.	POSIT.

NDN: nada digno de nota

CPE: efeito citopático (do tipo sincicial)

+: intensidade de CPE

-: não realizado

Fonte: Fotografia de garrafas com monocamadas de cultura de células da linhagem HRT-18G observadas por microscópio invertido ao aumento de 10X.

Figura 6 - (A) Monocamada com 48 horas de crescimento. (B) Monocamada após o sétimo dia de inoculação da amostra 42 na terceira passagem seriada, evidenciando efeito citopático do tipo sincicial bem característico de BCoV

6 DISCUSSÃO

A disenteria de inverno das vacas adultas é responsável por grandes perdas econômicas e inúmeros fatores envolvidos na cadeia epidemiológica de transmissão ainda carecem de melhor compreensão. O agente etiológico é o BCoV. A principal porta de entrada é a via oral, através de alimentos e fômites contaminados. O aparecimento de diarreia e/ou disenteria está relacionado aos fatores externos, tal como baixa temperatura e aglomeração, bem como aos fatores internos, tais como a presença de *Campylobacter jejuni*, um oportunista associado, cuja produção de endotoxinas pode provocar a coagulação intravascular, com conseqüente disenteria. A mortalidade é baixa, mas a produção de leite pode ser reduzida em até 90%. Os animais se recuperam com o tratamento sintomático, todavia raramente readquirem a performance na produção leiteira (ESPINASSE; SAVEY; VISO, 1990; TRAVÉN et al., 2001; JEONG et al., 2004).

A sazonalidade pode ser atribuída ao estresse térmico, contudo merecem atenção às mudanças de manejo, principalmente as que aumentam as densidades populacionais, facilitando, assim, a aproximação de fonte de infecção e suscetíveis. Além disso, em baixas temperaturas e com menor intensidade da luz UV tem-se um ambiente mais estável para a permanência do vírus viável em meio ambiente (BENFIELD; SAIF, 1990; CLARCK, 1993; ELLIS, 1998; PENSAERT et al., 1994).

A ocorrência de disenteria de inverno estava restrita ao hemisfério Norte, todavia a ocorrência de surtos em propriedades de criação de gado bovino leiteiro localizadas nos Estados de São Paulo e de Minas Gerais demonstrou que pode, também, estar presente no hemisfério Sul (BRANDÃO et al., 2002; BRANDÃO et al., 2005).

No presente trabalho pesquisou-se a presença de BCoV em 43 amostras de material fecal provenientes de vacas leiteiras com sinais clínicos de disenteria de inverno. As amostras foram colhidas em 8 propriedades de criação de gado bovino leiteiro, que já vinham apresentando suspeita clínica da enfermidade. A confirmação da presença de BCoV (Tabela 1) pode ser realizada em 10 amostras ($10/43 = 23\%$) e em 3 propriedades ($3/8 = 37\%$). Estes resultados confirmam a ocorrência da disenteria de inverno na região Sudeste do Brasil, tal como verificado por Brandão et al. (2005). Não foi possível a detecção na região Centro-Oeste, dado o pequeno número de amostras

provenientes dessa região. A comparação dos nossos resultados na região Sudeste com Brandão et al. (2005) não pode ser levada em consideração, uma vez que no presente trabalho foi pesquisado apenas a disenteria de inverno, não se levando em conta a diarreia neonatal.

A disenteria de inverno e a diarreia neonatal estão bastante relacionadas, todavia no presente trabalho o escopo fundamental repousa na metodologia de diagnóstico e no isolamento, para posterior caracterização antigênica.

A reação em cadeia pela polimerase para a amplificação dos segmentos do gene codificador da proteína RNA-polimerase-RNA-dependente (RT-PCR gene RdRp) tem baixo limiar de detecção e não apresenta as limitações relativas à utilização de soros hiperimunes policlonal, além de dispensar a utilização de animais de laboratório. A amplificação de uma região bastante conservada entre diversos coronavírus (STEPHENSEN et al., 1999; BRANDÃO et al., 2005) faz com que possa a tornar uma alternativa das mais promissoras como metodologia de diagnóstico laboratorial de alta sensibilidade e especificidade para estudos epidemiológicos que contemplem a prevalência da disenteria de inverno.

Por outro lado, para a caracterização antigênica das amostras detectadas por RT-PCR gene RdRp outras metodologias precisam ser empregadas, tal como a *nested* PCR dirigida à sequência de nucleotídeos do gene codificador do ectodomínio S1 (NAYLOR et al., 2001; WU;YAN, 2005; BRANDÃO et al., 2006).

Para tanto, a disponibilidade de amostra para a realização desta reação é o principal elemento. Considerando-se alguns fatores de ordem prática, tal como o período de tempo decorrido entre a colheita da amostra e os estudos prospectivos a serem realizados na caracterização da mesma, bem como a eventual necessidade de repetição de testes, a disponibilidade de material fecal colhido pode se constituir no maior obstáculo para se chegar à caracterização. Tudo isso, sem contar com a possibilidade de degradação do genoma através do longo período de conservação, seguido de sucessivos descongelamentos. Assim sendo, o isolamento de vírus em cultura de células apresenta-se como necessidade quase que imprescindível.

Em 7 amostras positivas por RT-PCR gene Rp Rd foi possível isolar 4 em monocamadas da linhagem HRT-18G.

Pela dificuldade de adaptação ao crescimento em cultura de células são poucos os trabalhos que relatam o isolamento de BCoV e as células da linhagem HRT-18G foram usadas com sucesso por Benfield e Saif (1989) para isolamento

primário a partir de material fecal e secreções nasais de bezerros gnotobióticos inoculados com material fecal proveniente de vaca adulta sintomática de disenteria de inverno. Jeong et al. (2004), em 20 casos de disenteria de inverno, comprovaram o isolamento de 10 amostras de BCoV em HRT-18G através de imunofluorescência na terceira passagem seriada.

A comparação dos nossos resultados de isolamento com os realizados com os realizados em outros estudos fica prejudicada pelas diferentes condições experimentais com que foram realizadas. No entanto, as células HRT-18G vem sendo as mais utilizadas em outros países por ser permissível ao BCoV (DEA et. Al., 1995; GUY et al., 2000)

Assim, nossas amostras isoladas em células HRT-18G poderão ser usadas para caracterização antigênica nas mesmas condições que estão sendo realizadas em outras partes do mundo.

Estudos continuados, visando a determinação da prevalência de disenteria de inverno por RT-PCR gene Rp Rd, seguida de isolamento em células HRT-18G, para sequenciamento da região de maior hipervariabilidade do ectodomínio S1 serão de grande valor no estudo epidemiológico da coronavirose bovina, quer na disenteria de inverno, quer na diarreia neonatal.

7 CONCLUSÕES

- 10 das 43 ($10/43 = 23\%$) amostras fecais foram positivas para a detecção de BCoV por meio de RT-PCR gene Rp Rd.
- 3 das 8 ($3/8 = 37\%$) propriedades estudadas apresentaram animais com resultados positivos.
- As propriedades localizavam-se na região Sudeste do Brasil.
- Em quatro amostras positivas foi possível isolar BCoV em monocamada de cultura de células da linhagem HRT-18G.
- As amostras isoladas apresentaram efeito citopática (sincicial), característico de BCoV, na sexta passagem.

REFERENCIAS*

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.

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.

BENFIELDM, D. A.; SAIF, L. J. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1454-1457, 1990.

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**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 103-104, 2002.

BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M. B.; LIMA, C. H. A.; ROSALES, C. A. R.; RUIZ, V. L. A.; JEREZ, J. A. Animal Coronaviruses. **Virus Reviews and Research**, v. 6, n. 1, p. 7-13, 2001.

BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J.; ROSALES, C. A. R.; VILLARREAL, L. Y. B.; JEREZ, J. A. Molecular analysis of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. **Archives Virology**, 2006. Disponível em:
<<http://www.springerlink.com/media/e39xtmmrmq0vgyjvudu7/contributions/m/2/3/6/m236v5j10x6k52j1.pdf>> Acesso em: 09 may 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 test for bovine coronavirus diagnosis based on the RNA-dependent RNA-polymerase gene. **Virus Reviews and Research**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2005.

BROES, A.; OPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G. Isolement d'un coronavirus chez des bovines atteints d'enterite hemorragique hivernale (winter dysentery) en Belgique. **Annals Medicine Veterinary**, v. 128, p. 299-303, 1984.

* De conformidade com as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. Revisada, atualizada e ampliada. São Paulo: SBD.FMVZ-USP, 2003. 84 p.

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

CASEBOLT, D. B.; BIAO, Q.; STEPHENSEN, C. B. Detection of enterotropic mouse hepatitis virus fecal excretion by polymerase chain reaction. **Laboratory Animal Science**, v. 7, n. 1, p. 6-10, 1997.

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

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.

CORNELISSEN, L. A.; WIERDA, C. M.; VAN DER MEER, F. J.; HERREWEGH, A. A.; HORZINEK, M. C.; EGBERINK, H. F.; GROOT, R. J. Hemagglutinin-esterase, a novel structural protein of torovirus. **Journal Virology**, v. 71, p. 5277-5286, 1997.

DEA, S.; ROY, R. S.; BETIN, M. E. Counterimmunoelectrophoresis for detection of neonatal calf diarrhea coronavirus: methodology and comparison with electron microscopy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, p. 240-244, 1979.

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

ELLIS, J. A. Forgotten bovine viruses: a cause for clinical concern? **Veterinary Medicine**, agosto, p. 765-768, 1998.

ESPINASSE, J.; SAVEY, M.; VISO, M. Winter dysentery of adult cattle virus. In: DINTER, Z.; MOREIN, B. (Ed.). **Virus infection of ruminants**. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V., 1990. p. 301-307.

ESPINASSE, J.; VISO, M.; LAVAL, A.; SAVEY, M.; LE LAYEC, C. I.; BLOT, J. P.; L'HARIDON, R.; COHEN, J. Winter dysentery: a coronavirus-like agente in the faeces of beef and dairy cattle with diarrhea. **Veterinary Record**, v. 110, p. 385, 1982.

GONZÁLEZ, J. M.; GOMEZ-PUERTAS, P.; CAVANAGH, D.; GORBALENYA, A. E.; ANJANES, 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.

HASOKSUZ, M.; SREEVATSAN, S.; KYOUNG-OH, C.; HOET, A. E.; SAIF, L. J. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. **Virus Research**, v. 84, p. 101-109, 2002.

HOGUE, B. G.; KING, B.; BRIAN, D. A. Antigenic relationship among proteins of bovine coronavirus, human respiratory coronavirus OC43, and mouse hepatitis coronavirus A59. **Journal Virology**, v. 51, p. 384-388, 1984.

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

HORNER, G. W.; HUNTER, R.; KIRKBRIDE, C. A.; A coronavirus-like agent present in feces of cows with diarrhea. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 23, p. 98, 1976.

ICTV – International Committee on Taxinomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>>. Acesso em: 29 abr. 2006.

JEONG, J. H.; KIM, G. Y.; YOON, S. S.; PARK, S. J.; KIM, Y. J.; SUNG, C. M.; JANG, O. J.; SHIN, S. S.; KOH, H. B.; LEE, B. J.; LEE, C. Y.; KANG, M. I.; KIM, H. J.; PARK, N. Y.; CHO, K. O. Detection and isolation of winter dysentery bovine coronavirus circulated in Korea during 2002-2004. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 2, p. 187-189, 2004.

JEREZ, J. A.; BRANDÃO, P. E.; BUZINARO, M. G.; GREGORI, F.; ROSALES, C. A. R.; ITO, F. H.; SAKAI, T. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários Municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 19-23, 2002.

JEREZ, J. A.; GREGORI, F.; BRANDÃO, P. E.; ROSALES, C. A. R.; ITO, F. H.; BUZINARO, M. G.; SAKAI, T. Isolation of bovine coronavirus (BCoV) in HmLu-1 monolayer cells. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 207-210, 2005.

JONES, F. S. Infections diarrhea (winter scours) of cattle. **Cornell Veterinarian**, v. 23, p. 117-122, 1933.

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

KSIAZEK, T. G.; ERDMAN, D.; GOLDSMITH, C. S.; ZAKI, S. R.; PERET, T. C.; EMERY, S.; SUXIANG, T.; URBANI, C.; COMER, J. A.; LIM, W.; ROLLIN, P. E.; DOWELL, S. F.; AI-EE, L.; HUMPHREY, C. D.; WUN-JU, S.; GUARNER, J.; PADDOCK, C. D.; ROTA, P.; FIELDS, B.; DERISI, J.; JYH-YUAN, Y.; COX, N.; HUGHES, J. M.; LEDUC, J. W.; BELLINI, W. J.; ANDERSON, L. J. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 38, n. 20, p. 1953-1966, 2003.

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

LAI, M. M. C.; HOLMES, K. V. Coronaviridae: The viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 4th Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001. p.1163-1185.

LIU, D. X.; INGLIS, S. C. Association of the infections bronchitis virus 3c protein with the virion envelope. **Virology**, v. 185, p. 911-917, 1991.

MASTERS, P. S. The molecular biology of coronaviruses. **Advances in Virus Research**, v. 66 p. 193-292, 2006.

MEBUS, C. A.; NEWMAN, L. E.; STAIR, E. L. Scanning electron, light, immunofluorescent microscopy of intestines of gnotobiotic calf infected with calf diarrheal coronavirus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 36, p. 1719-1725, 1975.

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 Inc. 1994. p. 627-696.

PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 84, p. 91-94, 2000.

REYNOLDS, D. J.; CHASEY, D.; SCOTT, A. C.; BRIDGER, J. C. Evaluation of ELISA and electron microscopy for the detection of coronavirus and rotavirus in bovine faeces. **Veterinary Record**, v. 114, p. 397-401, 1984.

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

SATO, K.; INABA, Y.; KUROGI, H.; TAKAHASHI, E.; SATADO, K.; OMORI, T.; MATUMOTO, M. Hemagglutination by calf diarrhea coronavirus. **Veterinary Microbiology**, v. 2, p. 83-87, 1977.

SATO, K.; INABA, Y.; TOKUHISA, S.; MIURA, Y.; KANEKO, N.; ASAGI, M.; MATUMOTO, M. Detection of bovine coronavirus in feces by reversed hemagglutination. **Archives of Virology**, v. 80, p. 23-31, 1984.

SATO, M.; AKASHI, H. Detection of bovine coronavirus by enzyme-linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, n. 5, p. 771-774, 1993.

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

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

SIDDELL, S. G. The small membrane glycoprotein. In: SIDDELL, S. G. **The Coronaviridae**. New York: Plenum. 1995. p. 181-1905.

SMITH, D. R.; FEDORKA-CRAY, P. J.; MOHAN, R.; BROCK, K. V.; WITTUM, T. E.; MORLEY, P. S.; HOBLET, K. H.; SAIF, L. J. Epidemiologic herd-level assessment of causative agents and risk factors for winter dysentery in dairy cattle. **American Journal Veterinary Research**, v. 59, n. 8, p. 994-1001, 1998.

STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; WHITE, R. G.; MEBUS, C. A. Neonatal calf diarrhea; purification and electron microscopy of a coronavirus-like agent. **American Journal of Veterinary Research**, v. 33, n. 6, p. 1147-1156, 1972.

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

TAKAHASHI, E.; INABA, Y.; SATO, K.; ITO, Y.; KUROGI, H.; AKASHI, H.; SATODA, K.; OMORI, T. Epizootic diarrhea of adult cattle associated with a coronavirus-like agent. **Veterinary Microbiology**, v. 5, p. 151-154, 1980.

TRAVEN, M.; NASLUND, K.; LINDE, N.; LINDE, B.; SILVAN, A.; FOSSUM, C.; HEDLUND, K.O.; LARSSON, B. Experimental reproduction of winter dysentery in

lactating cows using BCV -- comparison with BCV infection in milk-fed calves. **Veterinary Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 127-151, 2001.

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.

VABRET, A.; MOUTHON, F.; MOUREZ, T.; GOUARIN, S.; PETITJEAN, J.; FREYMUTH, F. Direct diagnosis of human respiratory coronaviruses 229E and OC43 by the polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 97, p. 59-66, 2001.

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**. The Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. 1167 p.

VERBEEK, A.; TIJSSEN, P. Polymerase chain reaction for probe synthesis and for direct amplification in detection of bovine coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 29, p. 243-256, 1990.

YAMADA, Y. K.; YABE, M.; OHTSUKI, T.; TAGUCHI, F. Unique N-linked glycosylation of murine coronavirus MHV-2 membrane protein at the conserved O-linked glycosylation site. **Virus Research**, v. 66, p. 149-154, 2000.