IRACEMA NUNES DE BARROS

**Um enfoque multigênico para a genealogia comparada de *Betacoronavirus*
em bovinos e equinos**

SÃO PAULO

2010

IRACEMA NUNES DE BARROS

**Um enfoque multigênico para a genealogia comparada de *Betacoronavirus*
em bovinos e equinos**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada as Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2010

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
16/11/10

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2367
FMVZ

Barros, Iracema Nunes de

Um enfoque multigênico para a genealogia comparada de *Betacoronavirus* em
bovinos e equinos / Iracema Nunes de Barros. -- 2010.
87 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2010.

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. Equinos. 4. Genealogia. 5. Epidemiologia. I.
Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Geneologia comparada de amostras de coronavírus bovino (BCoV) relacionadas à coronavirose neonatal com base nos genes codificadores das proteínas hemaglutinina-esterase (HE) e de espícula (S)", protocolado sob o nº1534/2008, utilizando 15 (quinze) bovinos, 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 26 de novembro de 2008.

We certify that the Research "Compared genealogy of bovine coronavirus (BCoV) strains related to neonatal coronavirus based on the genes encoding the proteins hemagglutinin-esterase (HE) and spike (S)", utilizing 15 (fifteen) bovine, protocol number 1534/2008, 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 Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/26/08.

São Paulo, 27 de novembro de 2008

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARROS, I.N.

Título: Um enfoque multigênico para a genealogia comparada de *Betacoronavirus* em bovinos e equinos.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*A minha alma gêmea que é:
minha amiga,
minha irmã,
meu pai e minha mãe,
mais conhecida por Jane.*

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o contrário.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, protegendo-me, guiando-me e ensinando-me.

A minha mãe, Josefa Rejane Nunes, por ser quem é, mãe e verdadeira amiga, sempre me dando apoio e amor incondicionais.

Ao meu pai, José de Barros Neto, por toda a torcida e amor.

Aos meus irmãos, Philipe Nunes de Barros, Cazuza Nunes de Barros e Xerazade Barros, pelo apoio e amor.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, pela amizade, confiança, paciência e ensinamentos científicos e de vida que guardarei sempre comigo.

A Professorinha Dra. Eugênia Márcia de Deus Oliveira, que provavelmente deve estar feliz no céu dos pesquisadores, agradeço muito pela amizade, confiança e apoio.

A minha segunda mãe, Rosely Bianca dos Santos Kuroda, meus irmãos, Luís Felipe e Júlio César, e ao meu segundo pai, Fábio Tavares, por me adotarem e pela amizade e amor infinitos.

Ao meu namorado e amigo Eduardo Mouco, por me entender, apoiar nos momentos difíceis, inclusive auxiliando na formatação e correção desse trabalho e por me amar.

Ao Prof. José Antonio Jerez, pelos conhecimentos científicos e inspiração.

Ao Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, por ser uma inspiração na virologia.

Ao Prof. Ricardo Augusto Dias, pela amizade, confiança e ensinamentos.

A todos os professores do VPS, que contribuem com a minha contínua formação.

A Sheila Oliveira de Souza e Silva por me iniciar e conduzir, com paciência, na biologia molecular, e pela amizade e apoio incondicionais.

A família Oliveira de Souza pela amizade e carinho.

Aos grandes amigos:, Camila Oliveira, Carolina Torres, Daniela Rodriguez, Francismar Petini, Giselle Ayres, Antonio F. Malheiros e Sueli Santos, pela amizade, apoio científico e/ou de vida.

Aos amigos Alessandra Castro, Alexandre Sanches, Amane, Cintia Favero, Cintia Baldin, Karen Asano, Sibele Souza, Vivianne Cambuí por tudo o que me ensinaram e por me auxiliarem sempre que precisei.

Ao Dr. Francisco Nogueira, pela confiança e apoio com amostras.

Agradeço a todos os que tenham colaborado para a execução desse trabalho, com os quais eu possa ser injusta por não mencionar.

Aos amigos do LABMAS e do VPS em geral, pois são muitos para serem aqui citados, pela torcida e apoio.

A todos os funcionários do VPS, pelo apoio e amizade.

A Tânia Delonero, por seu apoio prático na secretaria da pós-graduação.

As funcionárias da Biblioteca Virginie Buff D' Ápice pela atenção, ensinamentos sobre EndNote e redação de trabalhos científicos em geral.

A toda família Nunes e família Barros, em especial Tia Rosa, pela presença constante, apoio e amor incondicional.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcelos e a Profa. Dra. Solange Maria Gennari pela dedicação ao programa de pós-graduação.

Aos animais por existirem.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

RESUMO

BARROS, I. N. **Um enfoque multigênico para a genealogia comparada de *Betacoronavirus* em bovinos e equinos.** [A multigene approach for a compared genealogy of *Betacoronavirus* from cattle and horses]. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Gastroenterites são uma das causas mais comuns e importantes de morbidade e mortalidade entre animais neonatos e juvenis, em muitos casos, ocasionadas por uma infecção intestinal múltipla, sendo os principais agentes virais entéricos em bovinos o rotavírus e o coronavírus bovino (BCoV). O BCoV tem distribuição mundial e causa gastroenterites em bezerros, disenteria de inverno em bovinos adultos e processos patológicos respiratórios, enquanto que nos equinos os coronavírus causam enterocolite neonatal em potros. Considerando-se que o coronavírus bovino é mais estudado do que os coronavírus equinos, havendo possibilidade de transmissão interespecie, o presente trabalho teve por objetivo a comparação multigênica do coronavírus em bovinos adultos com disenteria de inverno e bezerros com diarreia neonatal e em equinos do Brasil, com base em sequências parciais dos genes codificadores das proteínas hemaglutinina-esterase (HE), espícula (S) e nucleoproteína (N). Foram utilizadas amostras fecais de 11 vacas leiteiras de um surto de disenteria de inverno e de 27 equinos testadas quanto a presença de *Betacoronavirus* com uma RT-PCR dirigida ao gene *RdRp*; em seguida, as amostras positivas foram submetidas as reações parciais de PCR para os genes *N*, *HE* e *S*, e posterior sequenciamento e análise genealógica. Além destas amostras, foram utilizadas 15 amostras fecais de bezerros, já estudadas parcialmente quanto ao gene *S*, submetidas as reações de RT-PCR para *N* e *HE*, e posterior sequenciamento e análise genealógica. Sequências representativas da população em estudo foram obtidas para todos os genes. Pode-se concluir que a genealogia de amostras entéricas de BCoV detectadas em bovinos jovens e adultos é diretamente associada a padrões geográficos quando se consideram os genes *S* e *HE*, sendo a genealogia de menor resolução para os genes *HE* e nucleoproteína *N*, para a qual há uma tendência a segregação por faixa etária do hospedeiro e que equinos podem apresentar *Betacoronavirus* indistinguíveis daqueles encontrados em bovinos.

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

ABSTRACT

BARROS, I. N. **A multigene approach for a compared genealogy of *Betacoronavirus* from cattle and horses** [Um enfoque multigênico para a genealogia comparada de *Betacoronavirus* em bovinos e equinos.]. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Gastroenteritis is one of the leading causes of morbidity and mortality amongst young and newborn animals, often caused by multiple intestinal infections, being rotavirus and Bovine coronavirus (BCoV) the main viral causes in cattle. BCoV has a worldwide distribution and caused diarrhea in calves, winter dysentery in adult cattle and respiratory disease, while in horses coronaviruses lead to neonatal enterocolitis in foals. Taking into account that BCoV is more largely studied than equine coronaviruses and the possibility of interspecies transmission of these viruses, this research aimed to assess a multigenic comparison of coronaviruses from adult cattle with winter dysentery and calves with neonatal diarrhea as well as from equines, all from Brazil, based on partial sequences of the hemagglutinin-esterase (*HE*), spike (*S*) and nucleoprotein (*N*) genes. To this end, 11 samples from dairy cows with winter dysentery and 27 from horses were tested for *Betacoronavirus* using an RT-PCR targeted to the *RdRp* gene and the positive samples were next submitted to RT-PCRs to the partial amplification and sequencing of *N*, *HE* and *S* genes for genealogic analysis. Besides, 15 calves samples previously studied for the same *S* gene region were also submitted to the *N* and *HE* genes RT-PCRs and sequencing for genealogic analysis. Sequences representative of the population under study were obtained for all genes. It could be concluded that enteric BCoV genealogy from newborn and adult cattle is directly associated to geographic patterns when *S* and *HE* genes are taken into account, with a less-resolved genealogy for the *HE* and *N* genes, with a trend for an age-related segregation pattern for the last and also that horses might present *Betacoronavirus* undistinguishable from those found in cattle, a fact previously unknown.

Keywords: Coronavirus. Bovine. Equine. Genealogy. Molecular Epidemiology.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
BCoV	Coronavírus bovino
CCoV	Coronavírus canino
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleosídeo-trifosfato
EqCoV	Coronavírus equino
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	Gramma (s)
h	Hora
HE	Hemaglutinina esterase
kDa	QuiloDalton
LABMAS	Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia
M	Molar
MCL	<i>Maximum Composite Likelihood</i>
µg	Micrograma
MHV	Vírus da hepatite murina
Min	Minuto de hora
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
N	Nucleocapsídeo
N.	Negativo
ng	Nanogramas
NJ	Neighbor-Joining
NT	Nucleotídeos
OC43	Coronavírus humano OC43

ORF	<i>Open reading frame</i>
pb	Par (es) de bases
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pmol	Picomoles
P.	Positivo
PR	Estado do Paraná
RNA	Ácido ribonucléico
RT	Transcrição reversa
S	Espícula
seg	Segundo(s)
SP	Estado de São Paulo
U	Unidade internacional
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
x g	Aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s ²)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
+	Mais
-	Menos
©	<i>Copyright</i>
®	Marca Registrada
μ	Micro
M	Mili
N	Nano
nº	Número
p	Pico
%	Porcentagem / por cento

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Árvore genealógica para sequências parciais de NT de 189 a 521 do gene *HE* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2) com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e modelo evolutivo MCL, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de coronavírus equino (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o MHV (AY700211). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio.....50
- Figura 2 - Árvore genealógica para sequências parciais de um segmento de 112 aa (NT de 189 a 521 do gene *HE* (em relação a amostra Mebus (U00735.2)) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e correção de Poisson, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o MHV (AY700211). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de Bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio.....51
- Figura 3 - Árvore genealógica para sequências parciais de NT de 1395 a 1667 do gene *S* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e modelo evolutivo MCL, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de coronavírus equino (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o CCoV (GQ477367). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio.....55
- Figura 4 - Árvore genealógica para sequências parciais de um segmento de 93 aa (NT de 1395 a 1667) do gene *S* (em relação a amostra Mebus (U00735.2)) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e correção de Poisson, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03,

USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de coronavírus equino (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o CCoV (GQ477367). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio.....56

Figura 5 - Alinhamento de um segmento de 93 aa (NT de 1395 a 1667) da região hipervariável da subunidade S1 da proteína S (em relação a amostra Mebus (U00735.2)). As amostras USP02 a USP14, LYVB, e as amostras de equinos estudadas (E17 e E19) referem-se as amostras com deleção de 18 nucleotídeos/ 6 aminoácidos na região analisada.....57

Figura 6 - Árvore genealógica para sequências parciais de NT de 172 a 359 do gene *N* (em relação a amostra Mebus (U00735.2)) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e modelo evolutivo MCL, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o CCoV (GQ477367). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio.....60

Figura 7 - Árvore genealógica para sequências parciais de um segmento de 67 aa (NT de 172 a 359 do gene *N* (em relação a amostra Mebus (U00735.2)) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e correção de Poisson, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o CCoV (GQ477367). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio.....61

Figura 8 - Alinhamento de sequências de NT de 172 a 359 do gene *N* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) As amostras E17, E19, um até 11 (exceto nove), USP01, USP03 e USP05 referem-se as amostras aqui estudada....62

Figura 9 - Alinhamento de um segmento de 67 aa (NT de 172 a 359 do gene *N* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) As amostras E17, E19, um até 11

(exceto nove), USP01, USP03 e USP05 referem-se as amostras aqui
estudadas.....63

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 - Amostras de coronavírus bovino (BCoV) provenientes de bezerros bovinos com os números de acesso GenBank para as respectivas sequências codificadoras da região S1 parcial, Estado de origem e ano de detecção.....	29
Quadro 2 - Amostras fecais de vacas leiteiras utilizadas no presente estudo.....	30
Quadro 3 - Amostras fecais de equinos utilizadas no presente estudo.....	31
Quadro 4 - <i>Primers</i> usados para a detecção do gene <i>RdRp</i>	34
Quadro 5 - <i>Primers</i> usados para a detecção do gene codificador da proteína HE.....	36
Quadro 6 - <i>Primers</i> usados para a detecção do gene codificador da proteína S.....	37
Quadro 7 - <i>Primers</i> usados para a detecção do gene codificador da proteína N	38
Quadro 8 – Amostras de coronavírus bovino (BCoV), equino (EqCoV), canino (CCoV), humano (OC43) e vírus da hepatite murina (MHV) utilizadas para a geração da árvore genealógica para cada gene e os respectivos números de acesso do GenBank.....	41
Quadro 9 – Resumo dos resultados obtidos nas Nested RT-PCR e no sequenciamento de DNA das amostras estudadas para os gene <i>HE</i> , <i>S</i> e <i>N</i>	46

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Identidade média (em porcentagem) de NT de 189 a 521 do gene *HE* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (USP) (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras (BR) de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo MHV (AY700211).....52
- Tabela 2 - Identidade média (em porcentagem) de aminoácidos de um segmento de 112 aa (NT 189 a 521) para o gene *HE* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo MHV (AY700211).....52
- Tabela 3 - Identidade média (em porcentagem) de NT de 1395 a 1667 do gene *S* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (USP) (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras (BR) de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo CCoV (GQ477367).....58
- Tabela 4 - Identidade média (em porcentagem) de aminoácidos de um segmento de 93 aa (NT 1395 a 1667) para o gene *S* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo CCoV (GQ477367).....58
- Tabela 5 - Identidade média (em porcentagem) de NT de 172 a 359 do gene *N* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (USP) (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras (BR) de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo CCoV (GQ477367).....64
- Tabela 6 - Identidade média (em porcentagem) de aminoácidos de um segmento de 67aa

(NT 172 a 359) para o gene *N* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano (AY585229) e o grupo externo CCoV (GQ477367).....64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	OBJETIVOS	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	AMOSTRAS	28
3.1.1	Bezerros.....	28
3.1.2	Vacas adultas leiteiras	29
3.1.3	Equinos.....	30
3.2	CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO	32
3.3	PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE RNA	32
3.4	APLICAÇÃO DE UMA NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO GENÉRICA DO GENE <i>RdRp</i> DE <i>Betacoronavírus</i>	32
3.5	APLICAÇÃO DE UMA HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA HEMAGLUTININA ESTERASE (HE) EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Betacoronavírus</i>	34
3.6	APLICAÇÃO DE UMA NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Betacoronavírus</i>	36
3.7	APLICAÇÃO DE UMA HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO (N) EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Betacoronavírus</i>	37
3.8	SEQUENCIAMENTO DE DNA	38
3.9	ANÁLISE GENEALÓGICA	39
4	RESULTADOS.....	43
4.1	NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO GENÉRICA DE <i>Betacoronavírus</i> EM AMOSTRAS DE FEZES BOVINAS E EQUINAS	43
4.2	HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA HEMAGLUTININA ESTERASE (HE) EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Betacoronavírus</i>	43
4.3	NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Betacoronavírus</i>	44

4.4	HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA DO NUCLEOCAPSÍDEO (N) EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>Betacoronavírus</i>	44
4.5	SEQUENCIAMENTO DE DNA	45
4.6	ANÁLISE GENEALÓGICA	48
4.6.1	Arvóres genealógicas para o gene <i>HE</i>	48
4.6.2	Arvóres genealógicas para o gene <i>S</i>	53
4.6.3	Arvóres genealógicas para o gene <i>N</i>	59
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76

1 INTRODUÇÃO

Gastroenterites são uma das causas mais comuns e importantes de morbidade e mortalidade entre animais neonatos e juvenis. Em muitos casos, a gastroenterite é resultado de uma infecção intestinal múltipla, com transmissão dos agentes causadores de animais mais velhos aos mais novos e de animais mais jovens para outros animais jovens (KANEENE, HURD, 1990; CEBRA et al., 2003).

Nos bovinos, as gastroenterites causam grandes perdas econômicas em virtude da morbidade e mortalidade em bezerros, da queda na produção leiteira e do rendimento econômico na criação de gado para corte e dos custos com tratamento e profilaxia (KANEENE, HURD, 1990; BOILEAU; KAPIL, 2010). Geralmente essas infecções ocorrem em associação com coronavírus bovino (BCoV), rotavírus do grupo A, vírus da diarreia viral bovina, *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sp. Entretanto, a maior importância pode ser atribuída ao rotavírus e ao BCoV, pois são frequentemente encontrados em diarreia neonatal em bezerros, tanto de corte quanto de leite no Brasil e em disenteria em bovinos adultos (BUZINARO et al., 2000; BRANDAO et al., 2002; JEREZ et al., 2002; BUZINARO et al., 2003; LANGONI et al., 2004; JEREZ, 2006; OLIVEIRA FILHO et al., 2007; BRANDAO et al., 2007).

Nos equinos, os principais agentes infecciosos causadores de gastroenterite são *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Rhodococcus equi*, *Proteus* sp., *Clostridium difficile* e *C. perfringes*, *Strongyloides westeri*, *S. vulgaris*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, rotavírus do grupo A, coronavírus e adenovírus (DURHAN; STEVENSON; FARQUHARSON, 1979; MAIR et al., 1990; REED; BAYLY, 2000). Contudo, o coronavírus pode atuar como patógeno primário em potros e causar enterocolite neonatal (GUY et al., 2000; DAVIS et al., 2000; BRANDAO et al., 2006b)

Atualmente, todos os coronavírus (CoVs) com proximidade genética e antigênica ao BCoV (CoVs BCoV-like), ou seja, o coronavírus humano OC43, o vírus hemaglutinante da encefalomielite suína (PHEV) e o coronavírus equino (EqCoV), são considerados não mais como vírus separados, mas como pertencentes a mesma espécie *Betacoronavirus 1* dentro do gênero *Betacoronavirus*, que era conhecido como grupo 2 dos coronavírus, mas ainda classificado na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*. Com a nova taxonomia, esta família é separada em duas subfamílias: *Torovirinae* e *Coronavirinae*, sendo que esta última

agora compreende além do gênero *Betacoronavirus*, outros dois gêneros: *Alphacoronavirus* e *Gammacoronavirus* (DE GROOT et al., 2008; ICTV, 2009).

Os coronavírus possuem RNA não segmentado, de fita simples, sentido positivo e simetria helicoidal, são envelopados, pleomórficos, aproximadamente arredondados com até 220nm de diâmetro, de comprimento de 27 a 32 kilobases (LAI e HOLMES, 2001). O nome coronavírus é derivado do latim *corona* que significa coroa devido ao aspecto do vírus visto ao microscópio eletrônico (TYRRELL, 1968). Esta morfologia se deve a glicoproteínas estruturais que se encontram na superfície viral. Além disso, os CoVs apresentam um genoma composto dos genes codificadores das proteínas poliproteína replicase (ORF1 – *open read frame 1*) , de espícula (S), de envelope (E), de membrana (M) e de nucleocapsídeo (N); contudo, alguns dos *Betacoronavirus* apresentam também o gene codificador da proteína hemaglutinina esterase (HE) (LAI e HOLMES, 2001; DE GROOT et al., 2008).

Os genes da *ORF1* consistem em mais de 20.000 nucleotídeos que inicialmente codificam duas grandes poliproteínas pp1a e pp1ab, (ZIEBURH; SNIJDER, 2007), que, durante ou após a síntese, são auto-clivadas por proteases presentes em seus domínios papaína-*like* (PLpro) e quimotripsina-*like* em 16 proteínas: nsp1 a nsp11 são codificados na ORF1a e nsp12 a nsp16, em ORF1b (SAWICKI; SAWICKI; SIDDELL, 2007). O complexo de proteínas da ORF1 tem como uma das funções catalisar as reações envolvidas na transcrição e replicação do RNA viral e, provavelmente, apresenta outras atividades como protease, polimerase, helicase, ADP-ribose-1'-fosfatase e RNase (ZIEBURH; SNIJDER, 2007).

A proteína S (*Spike*, traduzida do inglês: espícula) é a principal proteína estrutural de envelope e a mais polimórfica dos coronavírus. Esta proteína oligomérica apresenta 180 kDa (BOSCH et al., 2003), forma projeções de cerca de 20nm de comprimento responsáveis pela aparência espiculada do vírion (COLLINS et al., 1982) e pela atividade hemaglutinante e é o principal alvo dos anticorpos neutralizantes (SCHULTZE et al., 1991a). Em algumas espécies virais, como os antigos BCoV e EqCoV, é clivável em duas subunidades: S1, ectodomínio aminoterminal, e S2, subunidade carbóxi-terminal, com cerca de 90 kDa cada (CAVANAGH, 1995).

A primeira subunidade apresenta como função a ligação aos receptores celulares, é muito mais variável do que a S2 e forma o bulbo da espícula dos coronavírus que contém a maior parte dos sítios antigênicos (LAI; CAVANAGH, 1997; LEWICKI; GALLAGHER, 2002). Assim, a S1 e o segmento do genoma que a codifica são mais expostos a pressões

seletivas imunológicas e, portanto, estão mais propensos aos polimorfismos do que os demais genes e proteínas dos coronavírus (ABRAHAM et al., 1990).

Já a segunda subunidade não está envolvida na ligação ao receptor celular (TAGUCHI, 1995), forma a haste da espícula e é responsável pela fusão de membranas e formação de sincícios (LAI; CAVANAGH, 1997). Contudo, a S2 não apresenta domínios hidrofóbicos, assim, é possível que alterações conformacionais causadas pela S1 sejam responsáveis por esta atividade fusogênica (LEWICKI; GALLAGHER, 2002; BOSCH et al., 2003). Segundo, Yamada et al. (1997) substituições de aminoácidos no códon de iniciação e no sítio de clivagem ocasionam a perda da capacidade de formar sincícios e de clivagem no MHV.

A proteína E é o menor componente do envelope viral, com aproximadamente 10kDa (SIDDELL, 1995) e 75 a 110 aminoácidos, desempenhando um papel importante, mas ainda mal definido, na montagem e liberação do vírus (YE; HOGUE, 2007). Contudo, Kuo e Masters (2010) demonstraram que uma função de E é mediar interações entre os domínios dos monômeros da proteína M, sendo que na falta da proteína E, variantes da proteína M podem substituir a primeira, demonstrando, assim, a capacidade evolutiva dos coronavírus em novas funções gênicas por meio de recombinação.

A nucleoproteína N é uma conservada fosfoproteína de 50-60 KDa rica em aminoácidos básicos que interage com o RNA genômico para formar um nucleocapsídeo de simetria helicoidal (HOLMES; LAI, 1996; LAI; CAVANAGH, 1997; TAKIUCHI et al., 2006; MASTER, 2006), e está associada com o complexo transcrição-replicação viral (VERHEIJE et al., 2010), sendo crucial para a infectividade do RNA genômico dos coronavírus (HURST et al., 2010). Além disso, a presença da proteína N pode ajudar a estabilizar os complexos da proteína M durante a montagem do vírus. Estes complexos M interagem entre si (M-M) e com outras proteínas fundamentais como a N (M-N) e a S (M-S), desempenhando papel importante para a formação do envelope viral (ARNDT et al., 2010).

Já a proteína hemaglutinina esterase (HE) é exclusiva de alguns *Betacoronavirus*, como os *Betacoronavirus 1*, incluindo os BCoV e ECoV (DE GROOT et al., 2008), apresentando cerca de 65 kDa sob a forma de dímeros e, apesar de sua denominação, possui uma atividade hemaglutinante fraca quando comparada a da proteína S (KING; POTTS; BRIAN, 1985; SCHULTZE et al., 1991b; BRIAN; HOGUE; KIENZLE, 1995), mas contém uma enzima destruidora de receptores (esterase) que cliva resíduos 9-*O*-acetil de ácidos siálicos (CLARK, 1993). Um fato interessante é que a proteína HE dos coronavírus apresenta relação com a HE do vírus da influenza C, com a diferença que a proteína HE do BCoV sofre

dimerização rápida, exceto para o sinal de remoção de peptídeos, diferente da proteína do outro vírus que aparentemente não sofre dimerização (KIENZLE et al., 1990), o que indica uma possível recombinação entre estes dois vírus (LUYTJES et al., 1988), apesar de alguns *Betacoronavirus* apresentarem uma especificidade por substratos diferentes quando comparados a influenza C e ao BCoV (KLAUSEGGER et al., 1999).

O coronavírus bovino (BCoV) tem sido detectado em todos os continentes (JACTEL et al., 1990; ALENIUS et al., 1991; ABRAHAM; ROEDER; ZEWDU, 1992; FUKUTOMI; TSUNEMITSU; AKASHI, 1999; MILLANE; MICHAUD; DEA, 1995; CHO et al., 2000; BRANDAO et al., 2002) e causa gastroenterites em bezerros, e disenteria de inverno em bovinos adultos, doenças infecto-contagiosas agudas de ocorrência epizootica com tendência sazonal, que ocasiona graves prejuízos a pecuária, como perdas por mortalidade, aumento na conversão alimentar, custos com tratamentos e profilaxia e queda na produção leiteira (HOUSE, 1978; SNODGRASS et al., 1986; KANEENE, HURD, 1990). Contudo, além de processos entéricos, o BCoV causa alterações patológicas no trato respiratório superior de bezerros, e broncopneumonia (HECKERT et al., 1990; HECKERT et al., 1991; TEGTMEIER et al., 1999), ou a combinação de pneumonia e diarreia em bovinos jovens e adultos, devido ao tropismo do vírus por trato intestinal, passagens nasais, traquéia proximal e pulmões (BOILEAU; KAPIL, 2010).

Nos equinos, os coronavírus causam enterocolite neonatal em potros (DAVIS et al., 2000). O primeiro coronavírus em equinos foi detectado por Durham, Stevenson e Farquharson (1979) por meio de microscopia eletrônica. Após esta descoberta, Huang, Wright, Shipley (1983) isolaram um possível coronavírus em cavalos com síndrome de diarreia aguda eqüina. A seguir, outros estudos detectaram infecções por coronavírus em potros (MAIR et al., 1990; DAVIS et al., 2000; GUY et al., 2000).

No Brasil também foi detectado a presença de coronavírus em equinos jovens no Estado de São Paulo (BRANDAO et al., 2006b; LOPES et al., 2009; BARROS et al., 2009) e no Rio Grande do Sul (MEIRELES et al., 2008). Contudo, poucos estudos sobre a genealogia dos coronavírus encontrados em equinos foram realizados (GUY et al., 2000; ZHANG et al., 2007; BARROS et al., 2009).

Apesar de o coronavírus bovino ser mais estudado do que o coronavírus equino, deve-se considerar a possível transmissão interespecíes. Além disso, o BCoV é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária leiteira e de corte, e o EqCoV, na equinocultura. Sobretudo, há um grande desconhecimento acerca das características genéticas e antigênicas destes coronavírus e da relação entre o coronavírus responsável pela disenteria de inverno em

vacas adultas, e o que causa diarreia neonatal em bezerros e entre estes e o coronavírus da enterocolite neonatal em potros.

Por conseguinte, a comparação multigênica do coronavírus em bovinos adultos com disenteria de inverno e bezerros com diarreia neonatal, e em equinos do Brasil, com base nos genes codificadores das proteínas HE, S e N, é justificada para que ocorram avanços neste campo, uma vez que medidas profiláticas podem ser delineadas baseadas tanto na etiologia quanto na cadeia de transmissão, como, por exemplo, imunoprofilaxia e manejo sanitário e para que as relações filogenéticas entre estes vírus possam ser mais acuradamente compreendidas.

2 OBJETIVOS

Devido a importância das coronavíroses como causa de grandes perdas econômicas na bovinocultura e na equinocultura e a complexidade da taxonomia dos coronavírus, o presente trabalho teve por objetivos:

- Estudar a genealogia de amostras brasileiras de coronavírus bovino (BCoV) de modo comparado para os genes codificadores das proteínas hemaglutinina esterase (HE), espícula (S) e de nucleocapsídeo (N) em amostras virais detectadas em bovinos jovens e adultos.
- Pesquisar a frequência de ocorrência de *Betacoronavirus* em equinos.
- Analisar as relações filogenéticas entre amostras de BCoV de bovinos e amostras de *Betacoronavirus* detectadas em equinos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e a metodologia utilizados neste trabalho estão descritos nos itens a seguir.

3.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas neste estudo estão descritas a seguir.

3.1.1 Bezerros

Foi utilizado um total de 15 amostras fecais de bezerros bovinos de fazendas leiteiras (Quadro 1) já disponíveis no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada e Sorologia (LABMAS) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), armazenadas a -80°C e já estudadas previamente quanto a diversidade molecular em relação a região codificadora da subunidade S1 do gene *S* (BRANDAO et al., 2006a).

Para as análises genealógicas e filogenéticas, foi mantida a mesma identificação de amostras apresentada no quadro 1, independentemente do gene analisado.

Amostra	Acesso GenBank (gene S)	Origem	Ano de detecção
USP01	AY255831	MG	2001
USP02	AY606192	MG	2001
USP03	AY606193	MG	2001
USP04	AY606194	MG	2001
USP05	AY606195	MG	2001
USP06	AY606196	SP	2002
USP07	AY606197	SP	2001
USP08	AY606198	SP	2001
USP09	AY606199	SP	2002
USP10	AY606200	SP	2002
USP11	AY606201	SP	2002
USP12	AY606202	SP	2002
USP13	AY606203	SP	2002
USP14	AY606204	SP	2002
LYVB	AY606205	SP	2002

Quadro 1 – Amostras de coronavírus bovino (BCoV) provenientes de bezerros bovinos com os números de acesso GenBank para as respectivas sequências codificadoras da região S1 parcial, Estado de origem e ano de detecção

3.1.2 Vacas adultas leiteiras

Foram incluídas no estudo 11 amostras de vacas leiteiras (Quadro 2) enviadas ao LABMAS – VPS – FMVZ – USP, provenientes de uma propriedade leiteira do município de Ponta Grossa - PR, coletadas no dia 27 de julho de 2010 e enviadas para diagnóstico virológico.

A propriedade apresentava queda na produção leiteira e animais da raça Jersey com disenteria aguda, com presença de muco escuro, incluindo-se na amostragem animais sem disenteria.

Para as análises genealógicas e filogenéticas, foi mantida a mesma identificação de amostras apresentada no quadro 2, independentemente do gene analisado.

Amostra	Diarréia
1	Presente
2	Presente
3	Presente
4	Presente
5	Presente
6	Ausente
7	Ausente
8	Presente
9	Presente
10	Presente
11	Ausente

Quadro 2 – Amostras fecais de vacas leiteiras utilizadas no presente estudo

3.1.3 Equinos

Vinte e sete amostras de equinos de diferentes idades no momento da colheita (Quadro 3) foram também enviadas ao LABMAS, provenientes de um haras do município de Orlândia - SP, colhidas no ano de 2009, para diagnóstico virológico. No local da procedência destes equinos, relatou-se mortalidade neonatal de potros da raça Puro Sangue Inglês, sem, entretanto, a ocorrência de doença entérica, mas com relatos de doença respiratória e ausência de contato com outras espécies como bovinos.

Todos os equinos amostrados encontravam-se sem sinais de enterite no momento da colheita de amostras, tendo sido as amostras nomeadas de E1 até E27.

Para as análises genealógicas e filogenéticas, foi mantida a mesma identificação de amostras apresentada no quadro 3, independentemente do gene analisado.

Amostra	Idade
E1	5 dias
E2	7 dias
E3	11 anos e 4 dias
E4	1 ano, 3 meses e 5 dias
E5	1 ano, 2 meses e 21 dias
E6	1 ano, 2 meses e 16 dias
E7	1 ano, 2 meses e 21 dias
E8	8 anos, 3 meses e 21 dias
E9	1 ano e 2 meses
E10	9 anos, 1 mês e 14 dias
E11	19 anos e 29 dias
E12	1 ano, 1 mês e 3 dias
E13	1 ano, 7 meses e 28 dias
E14	2 anos, 1 mês e 12 dias
E15	13 anos e 3 dias
E16	26 dias
E17	7 meses e 13 dias
E18	1 ano, 1 mês e 2 dias
E19	1 ano, 6 meses e 1 dia
E20	5 meses e 24 dias
E21	2 anos, 2 meses e 17 dias
E22	1 ano, 2 meses e 10 dias
E23	6 meses e 8 dias
E24	1 ano, 2 meses e 27 dias
E25	1 ano, 1 mês e 6 dias
E26	1 ano, 3 meses e 22 dias
E27	7 meses e 17 dias

Quadro 3 – Amostras fecais de equinos utilizadas no presente estudo

3.2 CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO

A amostra viral de referência de BCoV Kakegawa (AKASHI et al., 1980), mantida em cultura de células da linhagem HmLu-1 (pulmão de hamster), com título hemaglutinante de 256, foi utilizada como controle positivo para as RT-PCRs e, controle negativo, água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil-pirocabonato (água DEPC).

3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE RNA

As amostras fecais foram preparadas como suspensões a 20% (v/v) em água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil-pirocabonato (água DEPC) e clarificadas a 5.000 x g/ 15min a 4 °C, tomando-se o sobrenadante como amostra.

A extração do RNA total do sobrenadante das amostras fecais, dos controles positivo (Kakegawa) e negativo (água DEPC) foi realizada com *TRIzol Reagent*® (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante, sendo armazenado o RNA extraído a -20°C para as etapas seguintes.

3.4 APLICAÇÃO DE UMA NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO GENÉRICA DO GENE *RdRp* DE *Betacoronavirus*

Todas as 27 amostras fecais de equinos e as 15 amostras fecais de vacas adultas leiteiras foram submetidas a nested RT-PCR para a amplificação de um fragmento de 136 pares de bases (pb) da região codificadora da RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) dos *Betacoronavirus* (BRANDÃO et al., 2005) como teste de triagem. As amostras de bezerros do presente projeto (Quadro 1) já haviam sido estudadas previamente, sendo positivas para o vírus estudado (BRANDÃO et al., 2006a). As amostras que resultaram positivas, foram, então, direcionadas para a amplificação dos genes *HE*, *S* e *N*.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), foram desnaturados 3,5µL do RNA extraído a 95°C durante 5 minutos, sendo estes adicionados ao *mix* de transcrição reversa

contendo 1x First Strand Buffer® (Invitrogen), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 2,5 ng de *Random Hexamers*® (Invitrogen) e 100U de M-MLV *Reverse Transcriptase*® (Invitrogen) para um volume final de 10µL, realizando-se a transcrição reversa a 42°C/60min.

Após a obtenção do cDNA, foi realizada a primeira amplificação por PCR pela adição de 2,5 µL de cada cDNA ao *mix* de PCR contendo 1 x PCR *Buffer*® (Invitrogen^M), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (4Bm e 2Bp) (Quadro 4), 1,5mM MgCl₂, 12,625 µL de água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 25 µL e submetidos a 6 ciclos de 94°C/1min, 40°C/2min e 72°C/1min, 36 ciclos de 94°C/1min, 50°C/1,5min e 72°C/1min seguidos por 72°C/10min para extensão final.

A segunda amplificação ou nested PCR foi realizada adicionando-se 2,5 µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de nested PCR contendo 1 x PCR *Buffer*® (Invitrogen^M), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* (CV2U e CV2L) (Quadro 4), 1,5mM MgCl₂, 16,625 µL de água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 25 µL submetidos a 26 ciclos de 94°C/1min, 54,8°C/1,5min e 72°C/1min, seguidos por 72°C/10min para extensão final.

Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada cinco amostras na extração de RNA e também foram realizadas as reações de nested RT-PCR para o monitoramento de contaminações. Além disso, durante todo o trabalho, cada etapa (extração de RNA, RT-PCR, nested, eletroforese e reação de sequenciamento de DNA) foi realizada em uma sala diferente com materiais e reagentes exclusivos para cada etapa, com o intuito de se evitarem contaminações por DNA amplificado, para as RT-PCRs para todos os genes em análise.

Dez microlitros do produto da segunda amplificação 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 ultravioleta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram bandas de 136pb.

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>	<i>Fragmento esperado</i>
4Bm	5' TCACAYTTWGGATARTCCCA 3'	251 pb
2Bp	5' ACTCARWTRAATYTNAAATAYGC 3'	
CV2U	5' TACTATGACTGGCAGAATGTTTCA 3'	136 pb
CV2L	5' AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA 3'	

Quadro 4 - *Primers* usados para a detecção do gene *RdRp*

3.5 APLICAÇÃO DE UMA HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA ESTERASE (HE) EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Betacoronavirus*

As amostras fecais de equinos e bovinos (adultos e bezerros) positivas para *Betacoronavirus* foram direcionadas para a aplicação de uma hemi-nested RT-PCR para o gene codificador da hemaglutinina esterase (*HE*), descrita por Souza et al. (2008b).

Utilizando-se o mesmo DNA complementar sintetizado como descrito no item 3.4 deste trabalho, foi realizada a primeira amplificação por PCR pela adição de 2,5 µL de cada cDNA ao *mix* de PCR contendo 1 x PCR *Buffer*® (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* (CHES e CHEA) (Quadro 5), 1,5mM MgCl₂, 12,625 µL de água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA Polymerase® (InvitrogenTM), para uma reação final de 25 µL e submetidos a 94°C/4min e 35 ciclos de 94°C/1min, 58,5°C/1,5min e 72°C/1min, seguidos por 72°C/10min para extensão final.

A segunda amplificação, ou hemi-nested PCR, para o gene *HE*, foi realizada adicionando-se 5 µL do produto da primeira ao *mix* de PCR contendo 1 x PCR *Buffer* (InvitrogenTM), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada *primer* (CHES e HE-NA, Quadro 5), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL de água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA polimerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 50µL, submetidos a 94°C/3min e 25 ciclos de 94°C/45seg, 53,4°C/45seg e 72°C/45seg para extensão de DNA e 72°C/10min para extensão final.

Um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada cinco amostras na extração de RNA e também foram realizadas as reações de nested RT-PCR para o monitoramento de contaminações.

Como as amostras fecais de bezerros (Quadro 1) estavam conservadas em freezer por oito a nove anos, o título viral nas amostras poderia ter decaído. Então, a fim de se obter o mais amplo número de sequências possível para estes genes, além da reação de hemi-nested com as condições citadas acima, realizaram-se variações nas hemi-nested PCR com as seguintes concentrações de ácidos nucleicos e de reagentes para aquelas amostras que resultassem negativas:

A) Dilui-se o material amplificado reduzindo a quantidade deste e aumentou-se a quantidade de água DEPC: utilizaram-se 2,5 µL do produto da primeira amplificação e 27,75 µL de água DEPC para uma reação final de 50µL, sendo os demais reagentes mantidos nas mesmas concentrações originais, seguindo-se mesmo protocolo do termociclador aplicado para a segunda amplificação para o gene *HE* mencionado anteriormente.

B) Concentrou-se o material amplificado aumentando a quantidade deste e reduzindo a quantidade da água DEPC:

B.1) Utilizaram-se 7,5 µL do produto da primeira amplificação e 22,75 µL de água DEPC para uma reação final de 50µL, sendo os demais reagentes mantidos nas mesmas concentrações originais, seguindo-se o mesmo protocolo do termociclador aplicado para a segunda amplificação para o gene *HE* mencionado anteriormente.

B.2) Utilizaram-se 10 µL do produto da primeira amplificação e 20,25 µL de água DEPC para uma reação final de 50µL, sendo os demais reagentes mantidos nas mesmas concentrações originais, seguindo-se o mesmo protocolo do termociclador aplicado para a segunda amplificação para o gene *HE* mencionado anteriormente.

B.3) Utilizaram-se 15 µL do produto da primeira amplificação e 15,25 µL de água DEPC para uma reação final de 50µL sendo os demais reagentes mantidos nas mesmas concentrações originais, seguindo-se o mesmo protocolo do termociclador aplicado para a segunda amplificação para o gene *HE* mencionado anteriormente.

A seguir, tanto das primeiras quanto das segundas (hemi-nested) amplificações, foram analisados dez microlitros do produto em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e observados sob luz ultravioleta. As amostras que apresentaram bandas de 796pb (PCR) ou 441 pb (hemi-nested PCR) foram consideradas positivas para o gene *HE*.

Primers	Sequência	Posição em <i>HE</i>*
CHES	5' TMT TTG GYG ACA GTC GTT C 3'	122-140
CHEA	5' TTA TCM GAM TGC YTR GCA TT 3'	898-917
HE-NA	5' CCC CAA AAT TAG CTT CAC GA 3'	543-562

* Em relação a amostra Mebus de BCoV (número de acesso Genbank U00735)

Quadro 5 - *Primers* usados para a detecção do gene codificador da proteína HE

3.6 APLICAÇÃO DE UMA NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Betacoronavirus*

As amostras fecais de equinos e de bovinos adultos positivas para *Betacoronavirus* foram direcionadas, também, para a aplicação de uma nested RT-PCR para o gene *S*.

As amostras de bezerros do presente projeto já foram estudadas previamente quanto a diversidade molecular em relação a região codificadora da subunidade S1 do gene *S* (BRANDAO et al., 2006a), estando as respectivas sequências disponíveis no Genbank sob os números de acesso amostrados no quadro 1.

Utilizando-se o mesmo DNA complementar sintetizado como descrito no item 3.4 deste trabalho, para a primeira amplificação 2,5µL do cDNA foram adicionados a combinação de reagentes para PCR contendo 1 x *PCR Buffer*® (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (S1HS e S1HA) (Quadro 6), 1,5mM MgCl₂, 12,625 µL de água DEPC e 0,625U de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen), para uma reação final de 25µL e submetidos a 94°C/4min e 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.

Para a segunda amplificação, ou nested PCR, para o gene *S*, adicionaram-se 5 µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de PCR contendo 1 x *PCR Buffer*® (Invitrogen),

0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (S1NS e S1NA) (Quadro 6), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL de água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen), para uma reação final de 50µL, submetidos a 94°C/ 3min e 25 ciclos de 94°C/1min, 58,4°C/1.5min e 72°C/1min para extensão de DNA e 72°C/10min para extensão final.

Assim como nos itens anteriores, um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada cinco amostras nas reações e todas as etapas foram realizadas em uma sala diferente com materiais e reagentes exclusivos para cada etapa, com o intuito de se evitarem contaminações por DNA amplificado.

Foram analisados dez microlitros do produto, tanto da primeira quanto da segunda amplificação, em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e observados sob luz ultravioleta. As amostras consideradas positivas apresentaram bandas de 885pb (PCR) ou 488 pb (nested PCR) para o gene *S*.

<i>Primers</i>	Sequência	Posição em <i>S</i>*
S1HS	5' CTATACCCAATGGTAGGA 3'	1024-2088
S1HA	5' CTGAAACACGACCGCTAT 3'	
S1NS	5' GTTCTGTAGCAGGTTTAA 3'	1329-1816
S1NA	5' ATATTACACCTATCCCCTTG 3'	

* Em relação a amostra Mebus de BCoV (número de acesso Genbank U00735)
Quadro 6 - *Primers* usados para a detecção do gene codificador da proteína *S*

3.7 APLICAÇÃO DE UMA HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA DE NUCLEOCAPSÍDEO (N) EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Betacoronavirus*

As amostras fecais de equinos e bovinos (adultos e bezerros) positivas para *Betacoronavirus* foram direcionadas, também, para a aplicação de uma hemi-nested RT PCR para o gene codificador da proteína do nucleocapsídeo (N), descrita por Asano (2009).

Utilizando-se o mesmo DNA complementar sintetizado como descrito no item 3.4 deste trabalho, foi realizada a primeira amplificação por PCR pela adição de 2,5 µL de cada cDNA ao *mix* de PCR contendo 1 x *PCR Buffer*® (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (BCoV1 e BCoV2) (Quadro 7), 1,5mM MgCl₂, 12,625 µL de água DEPC e

0,625U de Platinum Taq DNA Polymerase (InvitrogenTM), para uma reação final de 25 µL e submetidos a 94°C/4min, e 35 ciclos de 94°C/30seg, 50°C/30seg, 72°C/45seg, seguidos por 72°C/5min para extensão final.

A segunda amplificação, ou hemi-nested PCR, para o gene *N*, foi realizada adicionando-se 5 µL do produto da primeira ao *mix* de PCR contendo 1 x PCR Buffer® (Invitrogen), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (BCoV1 e BCoV3) (Quadro 7), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL de água DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA Polymerase® (Invitrogen), para uma reação final de 50µL, submetidos a 94°C/4min e 25 ciclos de 94°C/30seg, 55°C/30seg e 72°C/45seg para extensão de DNA e 72°C/5min para extensão final.

Assim como nos itens anteriores, um tubo contendo água DEPC foi adicionado a cada cinco amostras nas reações e todas as etapas foram realizadas em uma sala diferente com materiais e reagentes exclusivos para cada etapa, com o intuito de se evitarem contaminações por DNA amplificado.

A seguir, tanto da primeira quanto da segunda amplificação, foram analisados dez microlitros do produto em gel de eletroforese com agarose a 1,5 %, corados com brometo de etídeo a 0,5 µg/mL e observados sob luz ultravioleta. As amostras que apresentaram bandas de 463pb (PCR) ou 306 pb (hemi-nested PCR) foram consideradas positivas para o gene *N*.

<i>Primers</i>	Sequência	Posição em <i>N</i>*
BCoV1	5' AAGAGCTCAAYCCAAGCAAACCTGY 3'	123-146
BCoV2	5' AGCAGACCTTCCTGAGCCTTCAAT 3'	562-585
BCoV3	5' TCAATRTCCTGCTGCCATACTGGTCT 3'	405-428

* Em relação a amostra Mebus de BCoV (número de acesso Genbank U00735)
Quadro 7 - *Primers* usados para a detecção do gene codificador da proteína N

3.8 SEQUENCIAMENTO DE DNA

A purificação dos produtos de nested RT-PCR para os genes *HE* (441pb), *S* (488pb) e *N* (306pb) obtidos foi realizada a partir dos géis de agarose com o kit *GFXTM PCR DNA and GEL BAND Purification Kit®* (GE Healthcare), quantificado visualmente com *Low Mass DNA Ladder®* (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante e submetidos ao

sequenciamento bi-direcional de *DNA* em sequenciador automático ou ABI-377 (Applied Biosystems™).

A reação de sequenciamento 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 referente a cada amplicon 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 seg, 50°C/15 seg e 60°C/4 min, com rampa de 0,7°C/seg entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado a temperatura ambiente com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 30 minutos, centrifugando-se a 20.000 x g/25min, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 300µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 20.000 x g/15min e secando-se o precipitado a 95°C por 5 minutos, levando-se as amostras ao sequenciador automático ABI-377® (Applied Biosystems).

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo Phred online (EMBRAPA, 2006) para avaliação da qualidade dos mesmos, sendo utilizadas apenas as posições com escore maior do que 20, ou seja, menos de um erro a cada 100 bases sequenciadas.

A seguir, os cromatogramas foram conferidos manualmente com o programa Finch TV © (Geospiza) (ROBY, 2008) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciadas.

A sequência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit 7.0.9.0 v. 5.0.9 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida a BLASTn para confirmação do sequenciamento em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

3.9 ANÁLISE GENEALÓGICA

As sequências de nucleotídeos finais geradas para os genes *HE* e *S* e *N* no presente estudo foram alinhadas com sequências homólogas de BCoV e de EqCoV recuperadas do Genbank (Quadro 8), utilizando-se o método CLUSTAL/W com o programa Bioedit 7.0.9.0 (HALL, 1999).

Os três critérios de inclusão não mutuamente exclusivos de sequências do Genbank foram a disponibilidade simultânea dos genes *S*, *HE* e *N* para uma mesma amostra viral (com o intuito de se manter o mesmo conjunto de dados para todas as árvores), origem geográfica Brasileira (para se pesquisarem padrões filogeográficos) e classificação da amostra como pertencente a espécie coronavírus equino EqCoV, para se investigarem as relações filogenéticas entre estas e amostras virais detectadas em equinos no presente estudo.

Como grupos externos, utilizaram-se o *Alphacoronavirus* coronavírus canino (CCoV) para os genes *S* e *N* e vírus da hepatite murina (MHV) para o gene *HE*, visto ser o gene ausente em *Alphacoronavirus* e *Gammacoronavirus*. MHV não foi utilizado como grupo externo para *S* e *N* para que se tivesse de fato um grupo externo que tivesse divergido do grupo interno (*Betacoronavirus*) antes da especiação interna deste grupo.

Os alinhamentos foram utilizados para a geração das árvores com critério de otimização de distância, com algoritmo Neighbor-Joining e modelo evolutivo Maximum Composite Likelihood com 1.000 repetições de “bootstrap”, utilizando-se o programa MEGA 4 (TAMURA et al. 2007).

Para a geração da árvore de aminoácidos, as sequências de aminoácidos foram obtidas após a tradução das sequências de nucleotídeos dos genes *HE*, *S* e *N* alinhadas pelo método do CLUSTAL/W com o programa Bioedit 7.0.9.0 (HALL, 1999) e matriz BLOSUM62, gerando-se a árvore de aminoácidos com algoritmo Neighbor-Joining e correção de Poisson com 1.000 repetições de “bootstrap”, utilizando-se o programa MEGA 4 (TAMURA et al. 2007).

As identidades de aminoácidos foram calculadas com os programas Bioedit 7.0.9.0 (HALL, 1999) e Microsoft® Office Excel 2003.

(continua)

GENBANK	AMOSTRA	PAÍS	CORONAVIRUS	GENE
EF424616	E-AH65-TC	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
AF058944	OK-0514-3	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
AF391541	ISOLADO BCoV-ENT	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
EF424618	R-AH65-TC	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
EF424619	E-AH187	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
EF424615	E-AH65	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
EF424620	R-AH187	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
AF058943	LSU-94LSS-051-2	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
DQ811784	DB2	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
AF220295	Quebec	CANADÁ	BCoV	<i>HE, S e N</i>
U00735	Mebus	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
AB354579	Kakegawa	JAPÃO	BCoV	<i>HE, S e N</i>
AF058942	LY-138	EUA	BCoV	<i>HE, S e N</i>
AY585229	OC43-Paris	FRANÇA	OC43	<i>HE, S e N</i>
GQ477367	CCoV/NTU336/F/2008	TAIWAN	CCoV	<i>S e N</i>
AY700211	MHV A59	SUIÇA	MHV	<i>HE</i>
AY316300	NC99	EUA	EqCoV	<i>HE e S</i>
AF251144	Equine coronavirus	EUA	EqCoV	<i>N</i>
NC_010327	NC99	EUA	EqCoV	<i>HE, S e N</i>
EF446615	NC99	EUA	EqCoV	<i>HE, S e N</i>
cow/WDBR-9224/BRA/2003	GU808351	BRASIL	BCoV	<i>N</i>
	GU214768			<i>HE</i>
cow/WDBR-9215/BRA/2003	GU808350	BRASIL	BCoV	<i>N</i>
	GU214761			<i>HE</i>
cow/WDBR-9146/BRA/2003	GU808349	BRASIL	BCoV	<i>N</i>
	GU214767			<i>HE</i>
cow/WDBR-1275/BRA/2003	GU808348	BRASIL	BCoV	<i>N</i>
	GU214766			<i>HE</i>

Quadro 8 – Amostras de coronavírus bovino (BCoV), equino (EqCoV), canino (CCoV), humano (OC43) e vírus da hepatite murina (MHV) utilizadas para a geração da árvore genealógica para cada gene e os respectivos números de acesso do GenBank

(conclusão)

GENBANK	AMOSTRA	PAÍS	CORONAVIRUS	GENE
cow/WDBR-923/BRA/2003	GU808345	BRASIL	BCoV	<i>N</i>
	GU214769			<i>HE</i>
cow/WDBR-887/BRA/2003	GU808344	BRASIL	BCoV	<i>N</i>
	GU214765			<i>HE</i>
cow/WDBR-841/BRA/2003	GU808343	BRASIL	BCoV	<i>N</i>
	GU214763			<i>HE</i>
cow/WDBR-96/BRA/2003	GU808341	BRASIL	BCoV	<i>N</i>
	GU214757			<i>HE</i>
	FJ899737			<i>S</i>
BR-UEL1	DQ479421	BRASIL	BCoV	<i>S</i>
BR-UEL2	DQ479422	BRASIL	BCoV	<i>S</i>
BR-UEL3	DQ479423	BRASIL	BCoV	<i>S</i>
Kakegawa	DQ479424	BRASIL	BCoV	<i>S</i>

Quadro 8 – Amostras de coronavírus bovino (BCoV), equino (EqCoV), canino (CCoV), humano (OC43) e vírus da hepatite murina (MHV) utilizadas para a geração da árvore genealógica para cada gene e os respectivos números de acesso do GenBank

4 RESULTADOS

Os resultados baseados na metodologia definida para este trabalho estão descritos nos itens a seguir.

4.1 NESTED RT-PCR PARA DETECÇÃO GENÉRICA DE *Betacoronavirus* EM AMOSTRAS DE FEZES BOVINAS E EQUINAS

Todas as 11 amostras fecais de bovinos adultos (Quadro 2) e as amostras equinas E17 e E19 (Quadro 3) foram positivas para *Betacoronavirus*, resultando no amplicon de 136pb para o gene *RdRp*, bem como o controle positivo de BCoV (amostra Kakegawa).

As demais 25 amostras de equinos foram negativas, bem como todos os controles negativos incluídos nas reações.

4.2 HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA HEMAGLUTININA ESTERASE (HE) EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Betacoronavirus*

Das 15 amostras de bezerros testadas na hemi-nested RT-PCR para o gene *HE* (Quadro 1), cinco (Amostras identificadas como USP01, USP03, USP05, USP06 e USP07) apresentaram bandas de 441 pb (hemi-nested PCR) e foram consideradas positivas para o gene *HE*. A concentração ideal para as amostras resultarem positivas foi a mencionada no subitem b.1 do item 3.5, onde foram utilizados 7,5 µL do produto amplificado e 22,75 µL de água DEPC de modificação.

A diluição citada no subitem a.1 e a concentração do subitem b.3 do item 3.5, resultou em nenhuma amostra positiva para o gene *HE*. Já na concentração mencionada no subitem b.2, somente as amostras USP01, USP06 e USP07 resultaram positivas. E, na concentração inicialmente proposta neste trabalho, somente as amostras USP03 e USP05 resultaram positivas para este gene.

Com relação as 11 amostras de vacas adultas testadas na hemi-nested RT-PCR para o gene *HE* (previamente positivas para a presença de *Betacoronavirus* conforme descrito no item 4.1), todas apresentaram bandas de 441 pb (hemi-nested PCR), sendo, portanto, consideradas positivas para o gene *HE*.

As amostras E17 e E19 de equinos (previamente positivas para a presença de *Betacoronavirus* conforme descrito no item 4.1) apresentaram bandas de 441 pb (hemi-nested PCR), sendo, portanto, consideradas positivas para o gene *HE*.

A amostra Kakegawa de BCoV, utilizada como controle positivo, resultou na banda esperada de 441 pb para o gene *HE*, enquanto que nenhuma amplificação foi detectada nos controles negativos.

4.3 NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Betacoronavirus*

A aplicação da nested RT-PCR para o gene *S* nas duas amostras eqüinas e nas onze amostras bovinas de vacas leiteiras positivas para *Betacoronavirus* (item 4.1) resultou em bandas de 488 pb, exceto para a amostra de número nove (9) bovina (Quadro 2), da qual nenhuma amplificação foi detectada.

A amostra Kakegawa de BCoV, utilizada como controle positivo, resultou na banda esperada de 488 pb para o gene *HE*, enquanto que nenhuma amplificação foi detectada nos controles negativos.

4.4 HEMI-NESTED RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DA PROTEÍNA DE NUCLEOCAPSÍDEO (N) EM AMOSTRAS POSITIVAS PARA *Betacoronavirus*

As duas amostras eqüinas (E17 e E19) e as onze amostras bovinas de vacas leiteiras (positivas para *Betacoronavirus* segundo o item 4.1) apresentaram bandas de 306 pb (hemi-nested PCR) para o gene *N* e, das 15 amostras de bezerros testadas na hemi-nested RT-PCR

para o gene *N*, três (USP01, USP03, USP05) apresentaram bandas específicas da hemi-nested PCR e foram consideradas positivas para o gene *N*.

A amostra Kakegawa de BCoV, utilizada como controle positivo, resultou na banda esperada de 306 pb para o gene *HE*, enquanto que nenhuma amplificação foi detectada nos controles negativos.

4.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Para o gene *HE*, a partir dos amplicons das amostras USP01, USP03, USP05, USP06 e USP07, E17, E19 e amostras bovinas de 1 a 11, foram obtidas sequências de DNA viáveis (escore Phred > 20) para as amostras USP01, USP03, USP05, E17, E19 e amostras bovinas de 1 a 11. Assim, ainda que, para as amostras USP06 e USP07 tenham sido amplificadas as bandas esperadas, não foram obtidas sequências de tal qualidade para se proceder a análise genealógica.

Já para o gene *S*, o sequenciamento de DNA foi satisfatório para as amostras (E17, E19, amostra bovina de 1 a 11, exceto a nove, cujo produto não foi amplificado) e resultou em sequências de elevado escore (> 20) para o gene, conforme aferido pelo aplicativo Phred.

Para o gene *N*, foram obtidas sequências de DNA viáveis (escore Phred > 20) de todas as amostras amplificadas para este gene (USP01, USP03, USP05, E17, E19 e todas as amostras dos bovinos adultos (1 a 11)).

Para cada uma das sequências obtidas para os genes *HE*, *S* e *N* a análise de BLAST/n confirmou a identidade das mesmas, sendo que esta análise não produziu resultados não homólogos aos respectivos genes estudados com escores significativos.

O resumo dos resultados obtidos a partir das Nested RT-PCR e dos sequenciamentos de DNA das amostras estudadas está apresentado no quadro a seguir (Quadro 9).

(continua)

Amostra	Nested RT-PCR				Sequenciamento		
	<i>RdRp</i>	<i>HE</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>HE</i>	<i>S</i>	<i>N</i>
USP01	Brandão et al., 2006	P.	Brandão et al., 2006	P.	P.	P.	P.
USP02	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
USP03	Brandão et al., 2006	P.	Brandão et al., 2006	P.	P.	P.	P.
USP04	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
USP05	Brandão et al., 2006	P.	Brandão et al., 2006	P.	P.	P.	P.
USP06	Brandão et al., 2006	P.	Brandão et al., 2006	N.	N.	-	-
USP07	Brandão et al., 2006	P.	Brandão et al., 2006	N.	N.	-	-
USP08	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
USP09	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
USP10	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
USP11	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
USP12	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
USP13	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
USP14	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
LYVB	Brandão et al., 2006	N.	Brandão et al., 2006	N.	-	-	-
1	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
2	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
3	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
4	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
5	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
6	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
7	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
8	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
9	P.	P.	N.	P.	P.	-	P.
10	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
11	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.

P. – positivo / N. – negativo / (-) ausente

Quadro 9 – Resumo dos resultados obtidos nas Nested RT-PCR e no sequenciamento de DNA das amostras estudadas para os genes *HE*, *S* e *N*

(continua)

Amostra	Nested RT-PCR				Sequenciamento		
	<i>RdRp</i>	<i>HE</i>	<i>S</i>	<i>N</i>	<i>HE</i>	<i>S</i>	<i>N</i>
E1	N.	-	-	-	-	-	-
E2	N.	-	-	-	-	-	-
E3	N.	-	-	-	-	-	-
E4	N.	-	-	-	-	-	-
E5	N.	-	-	-	-	-	-
E6	N.	-	-	-	-	-	-
E7	N.	-	-	-	-	-	-
E8	N.	-	-	-	-	-	-
E9	N.	-	-	-	-	-	-
E10	N.	-	-	-	-	-	-
E11	N.	-	-	-	-	-	-
E12	N.	-	-	-	-	-	-
E13	N.	-	-	-	-	-	-
E14	N.	-	-	-	-	-	-
E15	N.	-	-	-	-	-	-
E16	N.	-	-	-	-	-	-
E17	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
E18	N.	-	-	-	-	-	-
E19	P.	P.	P.	P.	P.	P.	P.
E20	N.	-	-	-	-	-	-
E21	N.	-	-	-	-	-	-
E22	N.	-	-	-	-	-	-
E23	N.	-	-	-	-	-	-
E24	N.	-	-	-	-	-	-
E25	N.	-	-	-	-	-	-
E26	N.	-	-	-	-	-	-
E27	N.	-	-	-	-	-	-

P. – positivo / N. – negativo / (-) ausente

Quadro 9 – Resumo dos resultados obtidos nas Nested RT-PCR e no sequenciamento de DNA das amostras estudadas para os genes *HE*, *S* e *N*

4.6 ANÁLISE GENEALÓGICA

A análise genealógica obtida neste trabalho está descrita nos itens a seguir.

4.6.1 Árvores genealógicas para o gene *HE*

A árvore genealógica de sequências de nucleotídeos para o gene *HE* (Figura 1), na qual foram incluídas as sequências referentes as amostras estudadas (Quadro 9) bovinas de bezerros (USP01, USP03, USP05) e de vacas adultas (amostra 1 até 11, exceto a de nº nove), e equinas E19 e E17, além de sequências do GenBank (Quadro 8), mostrou que ambas as amostras equinas segregaram juntamente com amostras de BCoV incluídas neste estudo e outras recuperadas do Genbank, sendo inclusas no mesmo subgrupo da amostra de BCoV Kakegawa (nº de acesso no GenBank AB354579), divergindo das amostras de EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615).

Já as amostras de BCoV encontradas nas vacas leiteiras adultas (Quadro 2) segregaram todas em um grupo exclusivo, a parte das demais amostras de BCoV incluídas na árvore, distantes das amostras de disenteria de inverno do Estado de São Paulo (GU214768, GU214761, GU214767, GU214766, GU214769, GU214765, GU214763, GU214757) (Quadro 9).

Finalmente, as amostras de BCoV dos bezerros (USP01, USP03 e USP05) analisadas no presente estudo segregaram em um mesmo grupo junto com outras amostras BCoV, sem formação de grupamentos exclusivos.

Na árvore de sequências de aminoácidos para este gene (Figura 2), as amostras de equinos se mantiveram no mesmo grupo da amostra de BCoV Kakegawa (AB354579) e divergiram também do grupo das amostras de EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615).

Já as amostras de BCoV encontradas nas vacas leiteiras adultas e nos bezerros segregaram todas em um único grupo de modo indistinto e junto com outras amostras de BCoV, inclusive outras brasileiras (GU214768, GU214761, GU214767, GU214766, GU214769, GU214765, GU214763, GU214757) (Quadro 9).

Em relação as tabelas de identidade de nucleotídeos (NT) e aminoácidos (aa) para o gene *HE* (Tabelas 1 e 2), a menor porcentagem de identidade encontrada entre as duas

amostras eqüinas estudadas aqui e os grupos de amostras de coronavírus bovino (bezerros do estudo (Quadro 1), vacas leiteiras do estudo (Quadro 2), amostras brasileiras de BCoV de vacas leiteiras com disenteria de inverno (BR BCoV) e BCoV de outros países retiradas do GenBank (BCoV, outros países) (Quadro 8)) foi de 97,35% ou 96,81% para nucleotídeos e aminoácidos respectivamente, e, as maiores, foram de 98,25% e 97,65% respectivamente. Já entre essas duas amostras e amostras de EqCoV, a menor porcentagem de identidade foi de 71,65% para aminoácidos e a maior foi de 72,85% para nucleotídeos. Outros resultados de identidade entre os diversos grupos de amostras estudadas aqui são encontrados nas tabelas 1 e 2.

Figura 1. Árvore genealógica para sequências parciais de NT de 189 a 521 do gene *HE* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2) com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e modelo evolutivo MCL, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de coronavírus equino (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o MHV (AY700211). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio

Figura 2. Árvore genealógica para sequências parciais de um segmento de 112 aa (NT de 189 a 521 do gene *HE* (em relação a amostra Mebus (U00735.2)) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e correção de Poisson, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de ECoV (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o MHV (AY700211). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio

Tabela 1 - Identidade média (em porcentagem) de NT de 189 a 521 do gene *HE* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (USP) (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras (BR) de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo MHV (AY700211)

Grupos estudados para <i>HE</i>	Equinos (E17/E19)	Vacas leiteiras	Bezerros (USP)	BR BCoV	EqCoV	BCoV	OC43	Grupo externo
Equinos (E17/E19)	99,60	97,35	98,25	97,95	72,85	98,23	96,60	46,60
Vacas leiteiras	-	100	99,00	98,70	73,30	98,19	95,70	73,30
Bezerros (USP)	-	-	100	99,60	73,00	99,09	96,60	46,30
BR BCoV	-	-	-	100	73,30	98,79	96,90	46,00
EqCoV	-	-	-	-	99,73	72,79	72,70	42,60

Tabela 2 - Identidade média (em porcentagem) de aminoácidos um segmento de 112 aa (NT 189 a 521) para o gene *HE* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo MHV (AY700211)

Grupos estudados para <i>HE</i>	Equinos (E17/E19)	Vacas leiteiras	Bezerros (USP)	BR BCoV	EqCoV	BCoV	OC43	Grupo externo
Equinos (E17/E19)	99,00	97,65	97,65	97,65	71,65	96,81	94,95	19,60
Vacas leiteiras	-	100	100	100	73,90	98,85	97,20	19,60
Bezerros (USP)	-	-	100	100	73,90	98,85	97,20	19,60
BR BCoV	-	-	-	100	73,90	98,85	97,20	19,60
EqCoV	-	-	-	-	99,33	73,30	73,90	16,00

4.6.2 Árvores genealógicas para o gene *S*

A árvore genealógica de sequências de nucleotídeos para o gene *S* (Figura 3), na qual foram incluídas as sequências das amostras que apresentaram sequenciamento satisfatório (Quadro 9), além de sequências do GenBank (Quadro 8), mostrou que ambas as amostras equinas segregaram entre amostras de BCoV de bezerros da região Sudeste do Brasil, identificadas como USP, não tendo segregado em conjunto com as sequências referentes ao coronavírus equino EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615).

Este grupo no qual segregaram estas duas amostras de equinos contém as amostras de BCoV descritas por Brandão et al. (2006a) nas quais foi identificada uma deleção de 18 nucleotídeos/ 6 aminoácidos na região da subunidade S1 da proteína S analisada, também detectada aqui nas amostras E17 e E19 (Figura 5).

Por sua vez, a amostra USP01, que não apresenta a deleção mencionada, segregou com a amostra brasileira cow/WDBR-96/BRA/2003 (FJ899737) também da região Sudeste do Brasil, contudo originária de um bovino adulto.

Ainda sobre a árvore de sequências de nucleotídeos para o gene *S* as amostras de BCoV de vacas adultas leiteiras (Quadro 2) segregaram em um grupo único, como descrito para o gene *HE*.

Já sobre a árvore genealógica de sequências de aminoácidos para este gene (Figura 4), esta apresentou menor resolução quando comparada a árvore de nucleotídeos para *S*. Contudo, a amostra USP01, as amostras de vacas leiteiras adultas cujas sequências foram determinadas no presente estudo (Quadro 2) e a amostra brasileira cow/WDBR-96/BRA/2003 (FJ899737), dentre outras amostras (EF424618, EF424615, EF424616, AF058943, EF424619, AF058944), formaram um grupo, enquanto que as amostras com a deleção de seis aminoácidos mantiveram-se em um grupo exclusivo.

Em relação as identidades de nucleotídeos e aminoácidos para *S* (Tabelas 3 e 4), a menor identidade encontrada entre as duas amostras equinas estudadas e os grupos de amostras de coronavírus bovino (bezerros do estudo (Quadro 1), vacas leiteiras do estudo (Quadro 2), amostras brasileiras de BCoV de vacas leiteiras com disenteria de inverno (BR BCoV) e BCoV de outros países retiradas do GenBank (BCoV, outros países) (Quadro 8)) foi de 89,27% ou 89,60% para NT e aa respectivamente, e, as maiores, foram de 99,92% e 99,83% respectivamente. Entre essas duas amostras e amostras de EqCoV, a menor e a maior

porcentagem de identidade foi de 47,20% (NT) e 56,80% (aa). Outros resultados de identidade entre os diversos grupos de amostras estudadas aqui são encontrados nas tabelas.

Figura 3. Árvore genealógica para sequências parciais de NT de 1395 a 1667 do gene *S* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e modelo evolutivo MCL, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de coronavírus equino (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o CCoV (GQ477367). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio

Figura 4. Árvore genealógica para sequências parciais de um segmento de 93 aa (NT de 1395 a 1667) do gene S (em relação a amostra Mebus (U00735.2)) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e correção de Poisson, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de coronavírus equino (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o CCoV (GQ477367). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio

Figura 5. Alinhamento de um segmento de 93 aa (NT de 1395 a 1667) da região hipervariável da subunidade S1 da proteína S (em relação a amostra Mebus (U00735.2). As amostras USP02 a USP14, LYVB, e as amostras de equinos estudadas (E17 e E19) referem-se as amostras com deleção de 18 nucleotídeos/ 6 aminoácidos na região analisada

Tabela 3 - Identidade média (em porcentagem) de NT 1395 a 1667 do gene *S* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (USP) (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras (BR) de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo CCoV (GQ477367)

Grupos estudados para <i>S</i>	Equinos (E17/E19)	Vacas leiteiras	Bezerros (USP)	BR BCoV	EqCoV	BCoV outros países	OC43	Grupo externo
Equinos (E17/E19)	100	89,27	99,92	89,80	56,80	90,84	81,10	37,10
Vacas leiteiras	-	99,92	89,20	98,17	61,54	97,20	76,07	38,40
Bezerros (USP)	-	-	98,42	89,73	56,73	90,77	81,05	37,02
BR BCoV	-	-	-	97,72	60,99	97,08	75,85	38,17
EqCoV	-	-	-	-	100	61,04	55,70	39,00

Tabela 4 - Identidade média (em porcentagem) de aminoácidos do segmento de 93 aa (NT 1395 a 1667) para o gene *S* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo CCoV (GQ477367)

Grupos estudados para <i>S</i>	Equinos (E17/E19)	Vacas leiteiras	Bezerros (USP)	BR BCoV	EqCoV	BCoV outros países	OC43	Grupo externo
Equinos (E17/E19)	100	86,60	99,83	86,80	47,20	87,58	75,20	10,80
Vacas leiteiras	-	100	86,45	97,89	51,60	96,32	73,30	11,90
Bezerros (USP)	-	-	99,66	86,64	47,12	87,49	75,05	10,80
BR BCoV	-	-	-	96,62	51,05	95,37	72,75	11,17
EqCoV	-	-	-	-	100	51,60	48,30	12,90

4.6.3 Árvores genealógicas para o gene *N*

A árvore genealógica de sequências de nucleotídeos para o gene *N* (Figura 6), na qual foram incluídas as sequências das amostras que apresentaram sequenciamento satisfatório (Quadro 9), além de sequências do GenBank (Quadro 8), mostrou que ambas as amostras equinas segregaram no mesmo grupo da amostra de BCoV Kakegawa (AB354579), semelhante ao encontrado na árvore de sequências de nucleotídeos para o gene *HE* e divergiram também do grupo das amostras de EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615).

Já as amostras BCoV de bezerros da região Sudeste do Brasil, identificadas como USP, segregaram em um subgrupo distinto das amostras BCoV de vacas adultas (Quadro 2), semelhante ao encontrado nos outros genes (*HE* e *S*), contudo em menor resolução quando comparada ao gene *S*, uma vez que não houve a formação dos mesmos subgrupos descritos para os genes *S* e *HE*, sem a distinção geográfica para as amostras de BCoV brasileiras.

Por sua vez, a árvore de aminoácidos para a região da proteína de nucleocapsídeo estudada (Figura 7) resultou na formação de um único grupamento para todas as amostras de BCoV incluídas no estudo, sem resolução de sua topologia.

Quanto as amostras de equinos na árvore de aminoácidos para este gene, a amostra E17 deslocou-se para mais perto do grupo externo, devido a uma substituição de um nucleotídeo guanina (G) por citosina (C) em sua sequência de nucleotídeos na posição 274 do alinhamento (Figura 8), em relação ao gene *N* da amostra Mebus (sequência U00735.2)), resultando em uma substituição de aminoácidos valina para leucina (Figura 9), distanciando, assim, essa amostra da amostra E19 e das outras amostras de BCoV.

Finalmente, como encontrado para as demais árvores, as amostras de EqCoV mantiveram-se isoladas em um grupamento exclusivo.

Em relação as identidades de nucleotídeos e aminoácidos para *N* (Tabelas 5 e 6), a menor identidade encontrada entre as duas amostras equinas estudadas e os grupos de BCoV foi de 96,94% ou 97,18% para NT e aa respectivamente, e, as maiores, foram de 97,73% e 97,50% respectivamente. Entre essas duas amostras e amostras de ECoV, a menor e a maior porcentagem de identidade foi de 95,10% (aa) e 92% (NT). Outros resultados de identidade entre os diversos grupos de amostras estudadas aqui são encontrados nas tabelas.

Figura 6. Árvore genealógica para sequências parciais de NT de 172 a 359 do gene *N* (em relação a amostra Mebus (U00735.2)) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e modelo evolutivo MCL, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e como grupo externo o CCoV (GQ477367). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio

Figura 7. Árvore genealógica para sequências parciais de um segmento de 67aa (NT de 172 a 359) do gene *N* (em relação a amostra Mebus (U00735.2)) construída com critério de otimização de distância, com algoritmo NJ e correção de Poisson, destacando-se, em roxo, as amostras de bezerros (USP01, USP03, USP05), em azul, as amostras de vacas adultas leiteiras (um até 11, exceto a amostra nove) e em vermelho, as amostras de equinos (E17 e E19). Destacam-se também, outras amostras de EqCoV (AY316300, NC_010327 e EF446615), a amostra de coronavírus humano OC43 (AY5852229) e como grupo externo o CCoV (GQ477367). Os números próximos de cada nó representam os valores de 1000 repetições de bootstrap, tendo sido demonstrados apenas valores de bootstrap acima de 50%. A barra representa o número de substituições por sítio

Figura 8. Alinhamento de sequências de NT de 172 a 359 do gene *N* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)). As amostras E17, E19, um até 11 (exceto nove), USP01, USP03 e USP05 referem-se as amostras aqui estudadas

10 20 30 40 50 60
|.....|.....|.....|.....|.....
 ↓
 E17 NVVPYYSWFSGITQFQKGKDFEFAEQCG--VPIAPGLP--ATEAKGYWYRHNRRSFKTADGNQRQL
 E19|.....|.....|.....|.....|.....
 1|.....|.....|.....|.....|.....
 2|.....|.....|.....|.....|.....
 3|.....|.....|.....|.....|.....
 4|.....|.....|.....|.....|.....
 5|.....|.....|.....|.....|.....
 6|.....|.....|.....|.....|.....
 7|.....|.....|.....|.....|.....
 8|.....|.....|.....|.....|.....
 10|.....|.....|.....|.....|.....
 11|.....|.....|.....|.....|.....
 USP01|.....|.....|.....|.....|.....
 USP03|.....|.....|.....|.....|.....
 USP05|.....|.....|.....|.....|.....
 GU808351|.....|.....|.....|.....|.....
 GU808350|.....|.....|.....|.....|.....
 GU808349|.....|.....|.....|.....|.....
 GU808348|.....|.....|.....|.....|.....
 GU808345|.....|.....|.....|.....|.....
 GU808344|.....|.....|.....|.....|.....
 GU808343|.....|.....|.....|.....|.....
 GU808341|.....|.....|.....|.....|.....
 EF424616|.....|.....|.....|.....|.....
 AF058944|.....|.....|.....|.....|.....
 AF391541|.....|.....|.....|.....|.....
 EF424618|.....|.....|.....|.....|.....
 EF424619|.....|.....|.....|.....|.....
 EF424615|.....|.....|.....|.....|.....
 EF424620|.....|.....|.....|.....|.....
 AF058943|.....|.....|.....|.....|.....
 DQ811784|.....|.....|.....|.....|.....
 AF220295|.....|.....|.....|.....|.....
 U00735|.....|.....|.....|.....|.....
 AB354579|.....|.....|.....|.....|.....
 AF058942|.....|.....|.....|.....|.....
 AY5852229|.....|.....|.....|.....|.....
 AF251144|.....|.....|.....|.....|.....
 NC010327|.....|.....|.....|.....|.....
 EF446615|.....|.....|.....|.....|.....
 QQ477367 CCoV RSRSQSRSQ.RNRSQSR.RQOSNNKKODSVEQAVLAA.KKLGVDTEKQQQ.SRSK.KERSGSKT.DT

Tabela 5 - Identidade média (em porcentagem) de NT de 172 a 359 do gene *N* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (USP) (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras (BR) de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano OC43 (AY585229) e o grupo externo CCoV (GQ477367)

Grupos estudados para <i>N</i>	Equinos (E17/E19)	Vacas leiteiras	Bezerros (USP)	BR BCoV	EqCoV	BCoV outros países	OC43	Grupo externo
Equinos (E17/E19)	99,40	96,94	97,22	97,05	92,00	97,73	97,55	41,50
Vacas leiteiras	-	99,78	98,62	99,89	93,49	98,88	97,19	41,05
Bezerros (USP)	-	-	99,60	98,73	92,34	98,55	97,47	40,67
BR BCoV	-	-	-	100	93,60	98,99	97,30	41,00
EqCoV	-	-	-	-	100	92,91	93,00	40,50

Tabela 6 - Identidade média (em porcentagem) de aminoácidos do segmento 67aa (nucleotídeos 172 a 359) para o gene *N* (em relação a amostra Mebus (sequência U00735.2)) para os grupamentos estudados aqui (Equinos (E17 e E19), vacas leiteiras (Quadro 2), bezerros (Quadro 1)) e mais amostras brasileiras de BCoV (Quadro 9) e amostras de EqCoV, em comparação também, amostras de BCoV de outros países, a amostra de coronavírus humano (AY585229) e o grupo externo CCoV (GQ477367)

Grupos estudados para <i>N</i>	Equinos (E17/E19)	Vacas leiteiras	Bezerros (USP)	BR BCoV	EqCoV	BCoV outros países	OC43	Grupo externo
Equinos (E17/E19)	98,30	97,18	97,50	97,50	95,10	97,38	97,50	8,15
Vacas leiteiras	-	99,34	99,67	99,67	96,38	99,29	99,67	7,40
Bezerros (USP)	-	-	100	100	96,70	99,62	100	7,40
BR BCoV	-	-	-	100	96,70	99,62	100	7,40
EqCoV	-	-	-	-	100	96,33	96,70	7,40

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, amostras fecais de equinos e bovinos foram pesquisadas quanto a presença de *Betacoronavirus* utilizando-se reações de transcrição reversa-reação em cadeia pela polimerase para quatro diferentes genes (*RdRp*, *HE*, *S* e *N*), obtendo-se genealogias comparadas para os três últimos genes para amostras virais detectadas em ambas as espécies de hospedeiros.

Neste capítulo, serão discutidos inicialmente de modo geral os resultados da aplicação das técnicas de biologia molecular do gene as amostras biológicas estudadas, seguindo-se os resultados relativos aos coronavírus encontrados nos equinos e suas bases epidemiológicas e virológicas para cada um dos genes estudados com filogenia em comparação as amostras bovinas de *Betacoronavirus* e, a seguir, de modo similar, os achados relativos a coronavírus em amostras derivadas de bezerros bovinos e bovinos adultos em comparação a pesquisas similares já desenvolvidas.

Considerando-se os resultados obtidos na aplicação da nested RT-PCR para detecção de *Betacoronavirus*, dirigida ao gene *RdRp*, as amostras fecais dos 11 bovinos adultos foram positivas, o que demonstra inicialmente o envolvimento da espécie viral previamente denominada de BCoV na etiologia de processos patológicos entéricos naqueles animais com sintomatologia presente no momento da colheita de amostras (oito do total de 11 amostrados), um fato já estabelecido em etiologia de processos patológicos do trato entérico de bovinos adultos (ALENIUS et al., 1991; FUKUTOMI; TSUNEMITSU; AKASHI, 1999; BRANDAO et al., 2002; BRANDAO et al., 2007; NATSUAKI et al., 2007).

Um possível fator de risco para essa elevada ocorrência de disenteria de inverno nesses animais pode ter sido o estresse, visto que as amostras foram coletadas em um período de amplas flutuações de temperatura, além da possibilidade de outros fatores predisponentes, ambientais ou do próprio hospedeiro, como contato com outros animais, transporte, mudanças na dieta, longos períodos de confinamento, coinfeções secundárias e um fragilizado estado imunológico do animal (HASOKSUZ et al., 2002; BOILEAU; KAPIL, 2010).

No caso dos animais sem sintomatologia entérica, porém positivos para *Betacoronavirus*, é possível que estivessem em período de incubação, que pode ser de três a sete dias (RADOSTITS et al., 2000). Entretanto a presença de BCoV em fezes de bovinos adultos sadios sugere que estes animais podem servir como um reservatório da doença dentro do rebanho (CROUCH; ACRES, 1984; CROUCH et al., 1985).

Estes resultados demonstram que o BCoV continua sendo um patógeno importante em sanidade bovina e que merece maior atenção, sobretudo em relação a animais adultos, visto a insuficiente divulgação principalmente entre os médicos veterinários de campo e os proprietários sobre sua relevância.

Ainda sobre os resultados da detecção de *Betacoronavirus*, duas de vinte e sete amostras fecais testadas de equinos foram positivas. Algumas hipóteses para a baixa frequência de animais positivos podem ser propostas, como a ausência de animais sintomáticos, animais ainda em período de incubação do vírus (RADOSTITS et al., 2000), faixa etária além daquela descrita como fator de risco para diarreia viral (Quadro 3), o pequeno ou ausente contato com outros animais (TRAVERN et al., 2001) e mesmo um suficiente manejo sanitário do haras estudado (BARTELS et al., 2010).

Com relação aos equinos positivos para *Betacoronavirus*, estes animais não apresentavam sintomas entéricos. Pode-se inicialmente propor que estes animais tenham apenas ingerido estes coronavírus e os eliminados nas fezes sem infecção por serem refratários ao vírus, podendo ser uma fonte de infecção para animais suscetíveis (CROUCH et al., 1985).

Contudo, ainda que estes animais não apresentassem contato direto com bovinos no haras amostrado no presente estudo, há a possibilidade de transmissão por meio de fômites ou tratadores, proprietários ou médicos veterinários, por exemplo, vestimentas contaminadas por fezes bovinas contendo o vírus (PRATELLI, 2006; HASOKSUZ et al., 2007).

Outra possibilidade é que estes animais estivessem em convalescência, que tenham apresentado sintomas, voltado ao estado sadio, mas ainda estivessem excretando vírus via fezes. Contudo, segundo Jerez (2006), a excreção de agentes virais em animais com diarreia ocorre com títulos mais elevados no início dos sintomas, estimando-se que a eliminação nas primeiras horas seja da ordem de 10^8 a 10^9 partículas virais/mL de fezes em relação aos rotavírus, declinando progressivamente. Para coronavírus, sabe-se que a excreção viral pode permanecer em altos títulos por somente três dias, tornando-se a seguir intermitente e em baixos títulos (KAPIL et al., 1990).

Embora a diarreia seja reconhecida como a principal característica clínica de infecções por BCoV, estes vírus também provocam infecções no trato respiratório, como descrito para bovinos, podendo contribuir para o complexo de doença respiratória bovina (BRCoV), uma síndrome que afeta principalmente animais em confinamentos (BOILEAU; KAPIL, 2010) e que poderia ter ocorrido de modo assintomático ou mesmo não detectado nos equinos amostrados.

A diferenciação entre amostras entéricas e respiratórias de BCoV ainda não é completamente esclarecida. Sabe-se que coronavírus detectados em tratos respiratório e entérico de bovinos com disenteria de inverno podem pertencer a diferentes grupos antigênicos de acordo com sua reatividade frente a anticorpos monoclonais para a glicoproteína de espícula (FUKUTOMI; TSUNEMITSU; AKASHI, 1999), enquanto que em outros casos a identidade de nucleotídeos para o gene S entre amostras respiratórias e entéricas de BCoV foi elevada (ZHANG et al., 1994), podendo mesmo não haver distinção entre as mesmas (SOUZA et al., 2009).

Ainda, a reinfecção das vias respiratórias e entéricas de bovinos desafiados com amostras heterólogas de BCoV podem ocorrer, sugerindo que as reinfecções por vias diferentes podem constituir uma fonte de BCoV transmissíveis a animais adultos e jovens (CHO et al. 2001).

Outro ponto crítico para a detecção de *Betacoronavirus* nos equinos estudados, considerando-se a nested RT-PCR, poderia ter sido a ocorrência de reações inespecíficas. Não obstante, em todas as reações realizadas, foram incluídos controles positivos e negativos, e a confirmação da positividade foi realizada por meio de sequenciamento para os outros genes estudados (*N*, *HE* e *S*). Ainda, a RT-PCR aqui utilizada já foi demonstrada como específica, sem a ocorrência de amplificações não específicas (BRANDAO et al., 2005), e, assim, pode-se inferir que a interferência de falso-positivos pode ser descartada neste estudo.

Com isto, considerando que *Betacoronavirus* já foram demonstrados como patogênicos para equinos (MAIR et al., 1990; DAVIS et al., 2000; GUY et al., 2000), inclusive no Brasil (BRANDAO et al., 2006b; LOPES et al., 2009; MEIRELES et al., 2008), pode-se propor como a mais provável das hipóteses até aqui expostas que estes dois animais fossem portadores sadios que já tivessem passado pela fase clínica da infecção, ou seja, convalescentes, o que é apoiado pela baixa frequência de detecção entre os equinos estudados.

Assim, embora a etiologia de enterites em equinos ainda seja um problema sanitário pouco examinado quando com parada ao conhecimento disponível neste tema para bovinos em termos de etiologia e a relação de coronavírus encontrados em equinos com os coronavírus pertencentes ao gênero *Betacoronavirus* não esteja estabelecida de um modo completo, tais questões vêm sendo paulatinamente esclarecidas, sendo que os resultados até aqui expostos demonstram um padrão de doença e relação parasita-hospedeiro provavelmente similar ao que se tem em populações de bovinos.

Sobre os resultados obtidos na aplicação da hemi-nested RT PCR para o gene da hemaglutinina esterase, das 15 amostras fecais de bezerros estudadas (nomeadas como USP),

somente cinco foram positivas, sendo que alterações no protocolo desta reação foram realizadas, e o protocolo mais eficiente encontrado foi aquele no qual se utilizaram 7,5 µL do produto da primeira amplificação (PCR) para a segunda amplificação (hemi-nested).

Este pouco sucesso na amplificação parcial do gene *HE* a partir de amostras sabidamente positivas para *Betacoronavirus*, pode ser inicialmente atribuído ao longo tempo de conservação das amostras até o processamento, que variou de sete a oito anos, pela diversidade molecular na reação de hibridização dos primers ou mesmo por artefatos de técnica, como falhas de operação, reagentes ou equipamentos, ou mesmo o excesso de cDNA na fase de PCR ou DNA na hemi-nested PCR que podem levar a inibição da amplificação por DNA polimerase, como já relatado por Asano (2009). Contudo, alterações na concentração do material amplificado foram realizadas com o intuito de se minimizar o efeito inibitório de excesso e a pouca detecção pela escassez de DNA em relação aos resultados aqui obtidos.

Ainda sobre as falhas nas reações para o gene *HE*, considerando-se que este gene já foi demonstrado como altamente conservado para amostras brasileiras de BCoV (SOUSA, 2008a; SOUSA, 2008c), pode-se levantar a hipótese de que a ausência de hibridização de primers seja pouco provável. E, como já mencionado em materiais e métodos deste estudo, para cada partida/lote de reações realizadas, foram incluídos controles positivos e negativos, validando os diagnósticos realizados e, assim, falhas nas reações também podem ser consideradas como pouco verossímil.

Portanto, observando-se que apenas em concentração de DNA acima do padrão utilizado foram obtidas amplificações, pode-se considerar que, de fato, o baixo título viral nas amostras fecais associado ao longo tempo de conservação das amostras a -20°C e a conseqüente degeneração do RNA viral foram responsáveis pelo baixo sucesso na obtenção de amplicados para o gene *HE*. Por sua vez, nota-se que, em concentrações de DNA superiores (10 µL / reação), não houve amplificação, provavelmente em função de total degradação do RNA ou excesso de DNA (ASANO, 2009).

Mais modificações poderiam ser realizadas para se tentar obter um número maior de amplicons *HE* para as amostras de bezerras, incluindo-se novas colheitas. Todavia, as amostras que foram positivas para este gene foram tomadas como representativas da população estudada para o cumprimento dos objetivos propostos.

Ainda com relação aos resultados obtidos nas reações de hemi-nested RT PCR para o gene *HE*, todas as 11 amostras fecais de vacas leiteiras e as duas amostras equínas estudadas no presente estudo foram positivas. Com isto, pode-se ressaltar que o período de conservação das amostras de fato interferiu na sensibilidade destas reações e que os primers utilizados são

dirigidos a regiões conservadas, inclusive, demonstrando que todos os vírus estudados são *Betacoronavirus*, visto que *HE* é exclusividade deste gênero (DE GROOT et al., 2008).

Sobre a aplicação das reações para a subunidade S1 do gene *S*, das 11 amostras fecais de vacas leiteiras estudadas, nas quais se confirmou a presença de *Betacoronavirus*, dez foram positivas para este gene. Assim, somente uma amostra não resultou no amplicon para *S*. Esta negatividade se deve mais provavelmente a inadequações na reação de PCR, como já discutido para o gene *HE*.

Para os resultados obtidos na aplicação da hemi-nested RT PCR para o gene *N*, todas as 11 amostras fecais de vacas leiteiras e as duas amostras equinas estudadas foram positivas para este gene. Estes resultados são uma demonstração de que este gene é de fato altamente conservado, o que favorece o aumento da sensibilidade desta reação (ASANO et al., 2010).

Ainda sobre as reações para o gene *N*, das 15 amostras fecais de bezerros testadas, somente três foram positivas para este gene. Esta baixa positividade se deve, possivelmente, aquelas falhas já mencionadas para o gene *HE*, como tempo de conservação e artefatos de técnica.

Com relação ao sequenciamento de DNA para os genes *HE*, *S* e *N*, todas as amostras fecais de vacas leiteiras e as duas amostras equinas que resultaram nos amplicons esperados resultaram em sequências, porém, para as amostras de bezerros para o gene *HE*, somente três de cinco fragmentos obtidos nas PCRs resultaram em sequências de DNA com escore Phred > 20, mas, foram obtidas sequências viáveis para todas as amostras de bezerros sequenciadas (3/3) para o gene *N*.

O não sequenciamento satisfatório das duas amostras de bezerros (2/5) para o gene *HE*, pode ser justificada pela insuficiente concentração de DNA mesmo após as amplificações ou purificação a partir dos géis de agarose, processo este que pode ter levado a perdas de DNA durante sua realização, ou por artefatos de técnica, como sugerido para as reações de PCR. Todavia, apesar das falhas de sequenciamento em algumas amostras, obtiveram-se sequências representativas da população em estudo para todos os genes.

Em se tratando da análise genealógica, as amostras virais denominadas de E17 e E19, obtidas a partir de material fecal de equinos, não se agruparam com amostras de EqCoV já descritas (GUY et al., 2000; ZHANG et al., 2007), independentemente do gene e do fato de serem árvores de nucleotídeos ou aminoácidos, mas sim com o coronavírus bovino BCoV.

Estes resultados demonstram que o coronavírus encontrado nos equinos deste estudo são divergentes de EqCoVs e indistinguíveis do BCoV, não havendo relatos anteriores de BCoV em equinos (BARROS et al., 2010a).

Há poucos relatos de transmissão de outras viroses de equinos para bovinos, contudo, sabe-se que bovinos podem ser infectados com o vírus da influenza equina H3N8 (LIN et al., 2010), o que permite sugerir que equinos podem servir como reservatórios de doenças para bovinos e vice-versa, incluindo a coronavirose aqui estudada.

A presença de coronavírus semelhantes ao BCoV em hospedeiros não bovinos é de conhecimento já estabelecido, como em búfalos (DECARO et al., 2008a; SOUZA et al., 2008a; DECARO et al., 2010), lhamas e alpacas (CEBRA et al., 2003; GENOVA, et al., 2008), cervos (YOKOI, et al., 2009) e girafas (HASOKSUZ et al., 2007), demonstrando que este vírus pode se adaptar a outros herbívoros, incluindo os equinos, alvo do presente estudo, um fato previamente não relatado.

Como houve concordância para todos os genes estudados, não se detectaram recombinações. Uma afirmação também embasada nas identidades de nucleotídeos e aminoácidos (Tabelas 1 a 6), visto que a menor identidade encontrada entre as duas amostras eqüinas estudadas aqui e as amostras de coronavírus bovino foi de 89,27 e 86,60 para nucleotídeos e aminoácidos respectivamente, para S1, enquanto que as identidades entre as duas amostras equinas e as amostras de EqCoV foram de 56,8 e 47, 20 respectivamente, para o mesmo gene, tendo sido mantida a maior identidade, tendo sido mantida a maior identidade com amostras de BCoV para todos os genes estudados.

Ainda sobre as duas amostras de equinos estudadas, estas apresentaram a deleção em S1 já descrita para amostras bovinas de BCoV (BRANDAO et al., 2006a; BARROS, et al., 2009), demonstrado no agrupamento das árvores para o gene, o que traz consistência a hipótese discutida anteriormente de transmissão de BCoV de bovinos para equinos.

Estes achados em equinos demonstram que a linhagem de BCoV com a presença de deleção de seis aminoácidos em S1 ainda está presente, incluindo em uma região geográfica sem sua descrição prévia. Assim, estes equinos portadores desta linhagem viral podem servir de reservatórios para outros bovinos ou equinos, e com a comercialização e exposição de animais esta linhagem pode se distribuir para outras regiões, além de que possíveis alterações antigênicas podem ocorrer em S em função desta deleção, visto que a proteína S apresenta um maior polimorfismo quando comparada a outras (CLARK, 1993) e diferenças em estrutura primária de aminoácidos que levem a diferenças antigênicas entre amostras virais com e sem deleção podem ter consequências relativas a vacinação, pois esta só é efetiva se houver um elevado grau de identidade entre as amostras presentes no campo e aquelas presentes nas vacinas comerciais em uso. Assim, vacinas contendo mais linhagens com ampla reação

cruzada de BCoV podem ser necessárias para melhorar a eficácia das já existentes (SAIF, 2010).

Considerando-se as árvores de nucleotídeos e aminoácidos para a região do gene *N* sob análise (Figura 6 e 7), a amostra eqüina E17 se distanciou da amostras E19 e das amostras de BCoV na árvore de aminoácidos, devido a uma substituição de valina para leucina (Figura 9), enquanto que, para a árvore de nucleotídeos, as duas amostras equinas segregaram proximamente.

Como se nota na figura 8, uma única substituição de nucleotídeos G (guanina) para C (citossina) ocasionou a substituição de aminoácido em questão, elevando, para esta amostra, o número de substituições não-sinônimas, o que pode significar que a amostra E17 se encontra em adaptação ao hospedeiro equino, elevando sua divergência de uma amostra BCoV ancestral, pois se trata de seleção positiva neste específico caractere, com troca de aminoácido em uma proteína estrutural pouco polimórfica em BCoV, como demonstrado nas tabelas 5 e 6.

Com isto, pode-se especular que sucessivas passagens naturais da linhagem E17 entre equinos, sem a participação de bovinos, tenham levado a diferentes relações parasita-hospedeiro devido a diferenças em receptores, na replicação viral e no meio intracitoplasmático (MATIOLI, 2001; FORATTINI, 2005) e provavelmente, esta distância tenha tendência a se elevar ao longo do tempo.

Em relação ao gene *HE*, estas duas amostras equinas se agruparam em conjunto com a amostra Kakegawa. Por *HE* ser mais conservado do que *S* (SOUZA, 2008) este resultado poderia ser devido a origem comum entre as amostras de equinos aqui estudadas e a amostra Kakegawa. Ainda que esta tenha se originado no Japão (AKASHI et al., 1980), é possível que um ancestral comum das três amostras tenha se disseminado mundialmente. Deve-se, entretanto, considerar a possibilidade de uma convergência evolutiva, que possa ter levado a existência de mesmos estados de caracteres nas amostras E17, E19 e Kakegawa sem uma relação de ancestralidade comum para os caracteres em questão.

Somando-se o até aqui exposto, a linhagem de BCoV encontrada nestes dois equinos pode representar uma nova e desconhecida linhagem de BCoV no Brasil. Como não foram amostrados bovinos de modo simultâneo aos equinos nesta propriedade, ainda não se detectou esta linhagem em bovinos, o que poderia, então, confirmar esta proposição e aprimorar o entendimento epidemiológico molecular das coronaviroses entre populações equinas e bovinas

Em se tratando das amostras bovinas de BCoV, na árvore de nucleotídeos para o gene *HE* (Figura 1), houve formação de grupos exclusivos de amostras bovinas de vacas leiteiras estudadas aqui (Quadro 2), amostras de vacas com disenteria de inverno de outros estudos (BR BCoV), amostras de BCoV de outros países recuperadas do GenBank (BCoV, outros países) (Quadro 8) e amostras de bezerros (USP) estudadas aqui (Quadro 1).

Este padrão de segregação poderia ser derivado tanto a padrões filogeográficos quanto temporais, visto que as amostras foram coletadas e detectadas em diferentes períodos e de diferentes regiões geográficas; ainda, as diferentes faixas etárias dos animais amostrados, compartimentalizáveis em jovens e adultos, são uma variável a mais na árvore apresentada que poderiam também contribuir para o padrão de segregação encontrado.

Entretanto, pode-se eleger como mais provável variável para o padrão de segregação observado as diferenças geográficas de origem das amostras bovinas estudadas, uma vez que se sabe que não há marcadores para diferenciar linhagens de BCoV em bovinos adultos e jovens (CHO et al., 2001; TRAVEN et al., 2001) e, tampouco, para mudanças temporais (PARK et al., 2006; PARK et al., 2007; DECARO et al., 2008b).

Assim, essa tendência de microrregionalização das linhagens de BCoV pode permitir a detecção de assinaturas gênicas para estas linhagens (SOUZA, 2008; BARROS et al., 2010b) afim de aprimorar os métodos de diagnóstico baseados em biologia molecular para a diferenciação entre as mesmas, aperfeiçoar o entendimento da epidemiologia molecular dos coronavírus e estabelecer medidas de prevenção como imunógenos efetivos

Para a árvore de aminoácidos para *HE* (Figura 2), não houve distinção entre os grupamentos prévios de BCoV de adultos e bezerros. Este achado também é fundamentado na identidade de nucleotídeos e aminoácidos (Tabela 1 e 2), visto que a menor identidade de nucleotídeos e aminoácidos encontrada entre os grupos de BCoV foi de 98,20% e 98,85 respectivamente, indicando que a maior parte das mutações de nucleotídeos pode ter sido sinônima.

Com relação a árvore de nucleotídeos para o gene *S* (Figura 3), houve formação de dois grupos principais, sendo um grupo com amostras que apresentavam deleções de 6 aminoácidos na região hipervariável da subunidade S1 gene *S*, descrita por Brandão et al. (2006a) e um grupo que não apresentavam esta deleção; além disso, houve formação de um subgrupo exclusivo com amostras de vacas leiteiras do presente estudo. Na árvore de aminoácidos para *S* (Figura 4), foi mantida a distinção dos grupos com deleção e sem deleção, sem, contudo, haver a emergência do grupo restrito de amostras de vacas leiteiras do presente estudo.

Assim, sustentou-se o mesmo padrão de segregação do *HE* para *S*, mantendo-se a indicação de assinaturas gênicas regionais, por sua vez, apoiada também pelo surgimento de um grupo de BCoV procedentes do Estado do Paraná (DQ479421, DQ479422 e DQ479423).

A existência de um grupamento único de elevada identidade de sequência como para o caso do surto de disenteria em bovinos adultos aqui estudados pode ser primariamente devida a rápida transmissão de uma mesma linhagem entre os animais susceptíveis em uma mesma propriedade em função da elevada taxa de ataque da doença (TRAUVEN et al., 2001; SOUZA, 2008; BARROS et al., 2010c).

As árvores genealógicas de sequências de nucleotídeos e aminoácidos para o gene *S* (Figura 3 e 4) apresentaram maior resolução quando comparada as árvores para *HE*, demonstrando que, para a região gênica em análise, o gene *HE* é mais conservado entre diferentes amostras de BCoV quando comparado ao gene *S*. Um dos motivos para isto pode ser o fato de a proteína *S* levar a ligação vírus-receptor celular e fusão de membranas, sendo, assim, o principal alvo para anticorpos neutralizantes (COLLINS et al., 1982), e, portanto, sofrendo maior pressão de seleção com maior taxa de mutação quando comparada as demais proteínas dos coronavírus, como, por exemplo, a proteína *HE*, que é responsável pela ligação a receptores secundários e para a qual é esperado um menor polimorfismo (CLARK, 1993).

Para a árvore de aminoácidos para *S* (Figura 2), além de ter sido mantida a distinção dos grupos com deleção e sem deleção de seis aminoácidos, não houve divergência entre os grupamentos prévios de BCoV de adultos e bezerros, assim como para *HE*. Este fato fica também evidente quando se observam as identidades de nucleotídeos e aminoácidos (Tabela 3 e 4), visto que a menor identidade de nucleotídeos e aminoácidos encontrada entre os grupos de BCoV foi de 89,20% e 86,45 respectivamente.

Já na árvore genealógica de nucleotídeos para *N*, dois grupos de amostras de BCoV foram formados, sendo um grupo contendo as amostras de bezerros (USP) e outro contendo as demais. Contudo, dentre os três genes estudados neste estudo, *N* é de fato o mais conservado (LAI; CAVANAGH, 1997; MASTER, 2006). Assim, pode-se especular que o grupo de amostras de bezerros (USP) possui marcadores para diferenciação de BCoV em bezerros e vacas adultas, visto que o grupamento foi mantido apesar da não diferenciação geográfica; como já exposto, até o momento não são conhecidos marcadores para este nível de diferenciação, mas os resultados aqui encontrados podem servir de princípio para a validação de tais marcadores.

Para a árvore de aminoácidos para *N*, não houve divergência significativa entre as amostras de BCoV de adultos e bezerros, semelhante ao resultado encontrado para *HE* e *S*.

Uma afirmação também embasada na identidade de aminoácidos (Tabela 6), visto que a menor identidade encontrada entre as amostras de BCoV foi de 99,29%, indicando, também, que a maior parte das mutações de nucleotídeos é sinônima.

Uma vez que nucleoproteína N interage com o RNA genômico para formar um nucleocapsídeo de simetria helicoidal, pode-se esperar que o gene *N* sofra menos pressões seletivas imunológicas e mais do tipo estrutural propriamente dito, estando menos propenso a detecção de polimorfismos do que os demais genes (HOLMES; LAI, 1996; LAI; CAVANAGH, 1997; TAKIUCHI et al., 2006; MASTER, 2006), mas guardando diferenças genéticas e antigênicas entre as espécies de coronavírus, sendo assim crítico para a avaliação espécie viral/hospedeiro (HURST et al., 2010; VERHEIJE et al., 2010).

Coronaviroses em equinos são doenças infecciosas ainda insuficientemente estudadas em âmbito mundial; o presente estudo trouxe maior clareza sobre a evolução e a caracterização molecular de amostras entéricas de *Betacoronavirus* detectadas neste tipo de hospedeiro, mas futuros estudos neste tema devem incluir a amostragem simultânea de equinos e bovinos relacionados proximamente em uma área geográfica mais ampla para uma análise epidemiológica mais acurada, incluindo-se uma ampla pesquisa da ecologia de microorganismos no trato entérico destes animais e o sequenciamento de um maior número de genes dos coronavírus em questão em direção a obtenção de genomas completos; além disso, o isolamento destes vírus em cultivo celular poderá facilitar uma compreensão das características fenotípicas como a caracterização viral antigênica.

Por sua vez, ainda que os coronavírus em bovinos sejam estudados e conhecidos de um modo mais completo, permanecem ainda algumas incertezas com relação a alterações gênicas temporais e marcadores de virulência entre amostras de BCoV; um enfoque multigênico como o aqui apresentado, mas baseado em sequências mais extensas, incluindo aquelas codificadoras de proteínas não-estruturais, também em direção a obtenção de genomas completos, permitirá lançar luz sobre os estudos epidemiológicos clássicos.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados e na discussão desenvolvida, pode-se concluir que:

- A genealogia de amostras entéricas de BCoV detectadas em bovinos jovens e adultos é diretamente associada a padrões geográficos quando se consideram os genes codificadores da subunidade S1 da proteína de espícula S e hemaglutinina-esterase HE, sendo a genealogia de menor resolução para os genes codificadores das proteínas HE e nucleoproteína N, para a qual há uma tendência a segregação por faixa etária do hospedeiro.
- A frequência de ocorrência *Betacoronavirus* em equinos é baixa na população estudada.
- Equinos podem apresentar *Betacoronavirus* indistinguíveis daqueles encontrados em bovinos.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, G.; ROEDER, P. L.; ZEWDU, R. Agents associated with neonatal diarrhoea in Ethiopian dairy calves. **Tropical Animal Health and Production**, v. 24, n. 2, p. 74-80, 1992.
- 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, n. 1, p. 296-301, 1990.
- AKASHI, H.; INABA, Y.; MIURA, Y.; TOKUHISHA, S.; SATO, K. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 265-276, 1980.
- ALENIUS, S.; NISKANEN, R.; JUNTTI, N.; LARSSON, B. Bovine coronavirus as the causative agent of winter dysentery: serological evidence. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.32, n.2, p.163-170, 1991.
- ARNDT, A. L.; LARSON, B. J.; HOGUE, B. G. A conserved domain in the Coronavirus Membrane protein tail is important for virus assembly. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11418-11428, 2010.
- ASANO, K. M.; **Deteção simultânea de Coronavírus bovino e Rotavírus do grupo A em amostras fecais de bovinos utilizando uma multiplex hemi-nested RT-PCR**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ASANO, K. M.; SOUZA, S. P.; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 169, p. 375-379, 2010.
- BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O. S.; SANTOS, S.; TORRES, C. A.; ASANO, K. M.; SOUZA, S. P.; OLIVEIRA, C. P., RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Molecular characterization of *N*, *HE* and *S* partial genes of Brazilian neonatal bovine coronavirus strains. **Virus Reviews & Research**, v. 15. p. 83, 2010. Trabalho apresentado ao XXI National Meeting of Virology, Gramado, RS, 2010b.

BARROS, I. N.; NOGUEIRA NETO, F. S.; ASANO, K. M.; SILVA, S. O. S.; AYRES, G. R.; SOUZA, S. P.; SANTOS, J. D. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Characterization of brazilian strains of equine coronavirus (ECoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein. **Virus Reviews & Research**, v. 14. p. 91-92, 2009. Trabalho apresentado ao XX National Meeting of Virology, Brasília, DF, 2009.

BARROS, I. N.; NOGUEIRA NETO, F. S.; AYRES, G. R.; TORRES, C. A.; SILVA, S. O. S.; SANTOS, S.; ASANO, K. M.; SOUZA, S. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Coronavirus found in Brazilian equines is indistinguishable from bovine coronavirus (BCoV). **Virus Reviews & Research**, v. 15. p. 83-84, 2010. Trabalho apresentado ao XXI National Meeting of Virology, Gramado, RS, 2010a.

BARROS, I. N.; TORRES, C. A.; SANTOS, S.; AYRES, G. R.; SILVA, S. O. S.; ASANO, K. M.; OLIVEIRA, C. P.; SOUZA, S. P.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Molecular analysis of Bovine Coronavirus (BCoV) strains from a winter dysentery outbreak in dairy cows based on the partial *N*, *HE* and *S* genes. **Virus Reviews & Research**, v. 15. p. 109, 2010. Trabalho apresentado ao XXI National Meeting of Virology, Gramado, RS, 2010c.

BARTELS, C. J. M.; HOLZHAUER, M.; JORRITSMA, R.; SWART, W. A. J. M.; LAM, T. J. G. M. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 93, n. 2-3, p. 162-169, 2010.

BOILEAU, M. J.; KAPIL, S.; Bovine coronavirus associated syndromes. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 26, n. 1, p. 123-146, 2010.

BOSCH, B. J.; VAN DER ZEE, R.; DE HAAN, C. A. M.; ROTTIER, P. J. M. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. **Journal of Virology**, v. 77, n. 16, p. 8801-8811, 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.

BRANDAO, P. E.; GREGORI, F.; RICHTZENHAIN, L. J.; ROSALES, C. A.; VILLARREAL, L. Y.; JEREZ, J. A. Molecular analysis 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**, v. 151, n. 9, p. 1735-1748, 2006a.

BRANDAO, P. E.; GREGORI, F.; SFORSIN, A. J.; VILLARREAL, L. Y. B.; JEREZ, J. A.; Winter dysentery in cows associated with bovine *Coronavirus* (BCoV). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 1074-1076, 2007.

BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; VILLARREAL, L. Y. B.; RODRIGUEZ, C. A. R.; SOARES, R. M.; JEREZ, J. A.. A nested polymerase chain reaction to bovine coronavirus diagnosis. **Virus Reviews & Research**, v. 10, n. 1, p. 45-49, 2005.

BRANDÃO, P. E.; SOUZA, S. L. P.; TABET, A. F.; VILLARREAL, L. Y. B.; JEREZ, J. A.; An enteric coronavirus in a 3-day-old diarrheic foal. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 1, p. 101-103, 2006b.

BRIAN, D. A.; HOGUE, B. G.; KIENZLE, T. E. The coronavirus hemagglutinin esterase glycoprotein. In: SIDDELL, S. G. **The Coronaviridae**. New York: Plenum, 1995. p. 165–179.

BUZINARO, M. G.; MISTIERI, M. L. A.; CARVALHO, A. A. B.; SAMARA, S. I.; REGITANO, L. C. A.; JEREZ, J. A. Prevalência de rotavírus do grupo A em fezes diarréicas de bezerros de corte em sistema semi-intensivo de produção. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, 2003. DOI: 10.1590/S0102-09352003000300004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352003000300004&script=sci_arttext>. Acesso em: 18 set. 2010.

BUZINARO, M. G.; MUNFORD, V.; BRITO, V. M. E. D. ; RACZ, M. L.; JEREZ, J. A. Caracterização eletroforética e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, 2000. DOI: 10.1590/S0102-09352000000600001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352000000600001&script=sci_arttext>. Acesso em: 19 set. 2010.

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

CEBRA, C. K.; MATTSON, D. E.; BAKER, R. J.; SONN, R. J.; DEARING, P. L.; Potential pathogens in feces from unweaned llamas and alpacas with diarrhea. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 12, p. 1806-1803, 2003.

CHO, K. O.; HALBUR, P. G.; BRUNA, J. D.; SORDEN, S. D.; YOON, K.; JANKE, B. H.; CHANG, K.; SAIF, L. J.; CHO, K. O.; YOON, K. J.; CHANG, K. O. Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery-like disease. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 8, p. 1191-1194, 2000.

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.

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, n. 2, p. 358-371, 1982.

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

CROUCH, C. F.; ACRES, S. D. Prevalence of rotavirus and coronavirus antigens in the faeces of normal cows. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 48, n. 3, p. 338-393, 1984.

CROUCH, C. F.; OHMANN, H. B.; WATTS, T. C.; BABIUK, L. A. Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows. **Journal of General Virology**, v. 66, n. 7, p.1489-1500, 1985.

DAVIS, E.; RUSH, B. R.; COX, J.; DeBEY, B.; KAPIL, S.; Neonatal enterocolitis associated with coronavirus infection in a foal: a case report. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 12, n. 2, p. 153-156, 2000.

DECARO, N.; CIRONE, F.; MARI, V.; NAVA, D.; TINELLI, A.; ELIA, G.; DI SARNO, A.; MARTELLA, V.; COLAIANNI, M. L.; APREA, G.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Characterisation of bubaline coronavirus strains associated with gastroenteritis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 245-251, 2010.

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, n. 1-3, p. 30-39, 2008b.

DECARO, N.; MARTELLA, V.; ELIA, G.; CAMPOLO, M.; MARI, V.; DESARIO, C.; LUCENTE, M. S.; LORUSSO, A.; GRECO, G.; CORRENTE, M.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Biological and genetic analysis of a bovine-like coronavirus isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. **Virology**, v. 370, n. 1, p. 213-22, 2008a.

DURHAM, P. J. K.; STEVENSON, B. J.; FARQUHARSON, B. C.. Rotavirus and coronavirus associated diarrhea in domestic animals. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 27, n. 3, p. 30-32, 1979.

DE GROOT, R. J.; ZIEBUHR, J.; POON, L. L.; WOO, P. C.; TALBOT, P.; ROTTIER, P. J. M.; HOLMES, K. V.; BARIC, R.; PERLMAN, S.; ENJUANES, L.; **Taxonomic Proposal to the ICTV Executive Committee**: revision of the family *Coronaviridae*. [S. l.]: ICTV, 2008. Disponível em: <<http://talk.ictvonline.org/media/p/1230.aspx>>. Acesso em: 02 out. 2010.

EMBRAPA. Electropherogram quality analysis. Brasília: EMBRAPA, 2006. Disponível em: <<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>>. Acesso em: 05 nov. 2008 a 16 set. 2010.

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

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

GENOVA, S. G.; STREETER, R. N.; SIMPSON, K. M.; KAPIL, S. Detection of an antigenic group 2 coronavirus in an adult alpaca with enteritis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 10, p. 1629-1632, 2008.

GUY, J. S.; BRESLIN, J. J.; BREUHAUS, B.; VIVRETTE, S.; SMITH, L. G.; Characterization of a coronavirus isolated from a diarrheic foal. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 12, p. 4523-4526, 2000.

HALL, T. A. Bioedit 7.0.9.0: 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.

HASOKSUZ, 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.

HASOKSUZ, M.; HOET, A. E.; LOERCH, S. C.; WITTUM, T. E.; NIELSEN, P. R.; SAIF, L. J. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 308-313, 2002.

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, n. 2-3, 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.; **Fundamental Virology**. 3. ed., v. 1, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996. p. 1075-1093.

HOUSE, J. A. Economic impact of rotaviruses and other neonatal disease agents of animals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 173, n. 5, p. 573-576, 1978.

HUANG, J. C. M.; WRIGHT, S. L.; SHIPLEY, W. D.; Isolation of coronavirus-like agent from horses suffering from acute equine diarrhea syndrome. **The Veterinary Record**, v. 113, n. 17, p. 262-263, 1983.

HURST, K. R.; YE, R.; GOEBEL, S. J.; JAYARAMAN, P.; MASTERS, P. S. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 10276-10288, 2010.

ICTV- International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy**: 2009 release. Disponível em <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009>>. Acesso em 02/10/2010.

JACTEL, B.; ESPINASSE, J.; VISO, M.; VALIERGUE, H. An epidemiological study of winter dysentery in fifteen herds in France. **Veterinary Research Communications**, v. 14, n. 5, p. 367-379, 1990.

JEREZ, J. A. **Diarréias virais dos bovinos: rotavirose e coronavirose**. Tese (Livre Docência em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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 diarréia criados em vários municípios do Estado de São Paulo, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 19-23, 2002.

KANEENE, J. B.; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, n. 2-3, p. 127-140, 1990.

KAPIL, S.; TRENT, A. M.; GOYAL, S. M.. Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. **Archives of Virology**, v. 115, n. 1-2, p. 127-132, 1990.

KIENZLE, T. E.; ABRAHAM, S.; HOGUE, B. G.; BRIAN, D. A. Structure and orientation of expressed bovine coronavirus hemagglutinin-esterase protein. **Journal of Virology**, v. 64, n. 4, p. 1834-1838, 1990.

KING, B.; POTTS, B. J.; BRIAN, D. A. Bovine coronavirus haemagglutinin protein. **Virus Research**, v. 2, n. 1, 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.

KUO, L.; MASTERS, P. S. Evolved variants of the membrane protein can partially replace the envelope protein in murine coronavirus assembly. **Journal of Virology**, 2010.
DOI:10.1128/JVI.01850-10. Disponível em:
< <http://jvi.asm.org/cgi/reprint/JVI.01850-10v1?view=long&pmid=20926558>>. Acesso em: 02 out. 2010.

LAI, M. M. C.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronavirus. **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.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAUS, S.E.; **Fields Virology**. 4. ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 1163-1185.

LANGONI, H.; LINHARES, A. C.; AVILA, F. A.; DA SILVA, A. V.; ELIAS, A. O. Contribution to the study of diarrhea etiology in neonate dairy calves in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 313-319, 2004.

LEWICKI, D. N.; GALLAGHER, T. M.; Quaternary structure of coronavirus spikes in complex with carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule cellular receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19727-19734, 2002.

LIN, C.; HOLLAND, R. E. JR.; McCOY, M. H.; DONOFRIO-NEWMAN, J.; VICKERS, M. L.; CHAMBERS, T. M. Infectivity of equine H3N8 influenza virus in bovine cells and calves. **Influenza Other Respiratory Viruses**, v. 4, n. 6, p. 357-361, 2010.

LOPES, V. S.; BRANDAO, P. E.; CATROXO, M. H. B.; RUIZ, V. L. A.; GREGORI, F. Ocorrência de coronavírus em equinos no Estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71, suplemento, p.18, 2009. Trabalho apresentado ao 6º CICAM - Congresso de Iniciação Científica em Ciências Agrárias, Biológicas e Ambientais do Instituto Biológico, São Paulo, SP, 2009.

LUYTJES, W.; BREDENBEEK, P. J.; NOTEN, A. F.; HORZINEK, M. C.; SPAAN, W. J.; Sequence of mouse hepatitis virus A59 mRNA2: indications for RNA-recombination between coronaviruses and influenza C virus. **Virology**, v. 166, p. 415-422, 1988.

MAIR, T. S.; TAYLOR, F. G. R.; HARBOUR, D. A.; PEARSON, G. R. Concurrent cryptosporidium and coronavirus infections in an Arabian foal with combined immunodeficiency syndrome. **Veterinary Record**, v. 126, n. 6, p. 127-130, 1990.

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

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

MEIRELLES, M.; LINS, L. A.; FREY JR., F.; KASINGER, S.; NOGUEIRA, C. E. W.; Enterite por coronavírus em potros Puro Sangue Inglês em um haras no Rio Grande do Sul. **XVII Congresso de Iniciação Científica e X Encontro de Pós-Graduação**, 2008.

Disponível em:

< http://www.ufpel.edu.br/cic/2008/cd/pages/pdf/CA/CA_01337.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2009.

MILLANE, G.; MICHAUD, L.; DEA, S. Biological and molecular differentiation between coronaviruses associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult cattle. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 380, p.29-33, 1995.

NATSUAKI, S.; GOTO, K.; NAKAMURA, K.; YAMADA, M.; UEO, H.; KOMORI, T.; SHIRAKAWA, H.; UCHINUNO, Y. Fatal winter dysentery with severe anemia in an adult cow. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 9, p. 957-960, 2007.

OLIVEIRA FILHO, J. P., SILVA, D. P. G.; PACHECO, M. D.; MASCARINI, L. M.; RIBEIRO, M. G.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.; STIPP, D. T.; BARROS, B. J. P.; BORGES, A. S.. Diarréia em bezerros da raça Nelore criados extensivamente: estudo clínico e etiológico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 10, p. 419-424, 2007.

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 with diarrhea during the warmer seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3178-3188, 2006.

PARK, S. J.; KIM, G. Y.; CHOY, H. E.; HONG, Y. J.; SAIF, L. J.; JEONG, J. H.; PARK, S. I.; KIM, H. H.; KIM, S. K.; SHIN, S. S.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. **Archives of Virology**, v. 152, n. 10, p. 1885-1900, 2007.

PRATELLI, A. Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. **Veterinary Research**, v. 37, n. 2, p. 191-200, 2006.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses**. 9. ed. London: W.B. Saunders, 2000. 1877 p.

REED, S. M.; BAYLY, W. M., **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 822-825.

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.

ROBY, R. K.; **High throughput mitochondrial DNA analysis**: optimization of sequence chemistry, characterization of local dye terminator sequencing frames, and tools for the development of an expert system. 2008. 225 p. Tesis (Doctoral), Universidad de Granada, Granada, 2008.

SAIF, L. J. Bovine respiratory coronavirus. **The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice**, v.26, n. 2, p. 349-364, 2010.

SAWICKI, S. G.; SAWICKI, D. L.; SIDDELL, S. G.; A contemporary view of coronavirus transcription. **Journal of Virology**, v. 81, n. 1, p. 20-29, 2007.

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, n. 11, p. 6232-6237, 1991a.

SCHULTZE, B.; WAHN, K.; KLENK, H. D.; HERRLER, G.; Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. **Virology**, v. 180, n. 1, p. 221-228, 1991b.

SIDDELL, S.; WEGE, H.; TER MEULEN, V. The biology of coronaviruses. **Journal of General Virology**, v. 64, n. 4, p. 761-776, 1983.

SNODGRASS, D. R.; TERZOLO, H. R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J. D.; SYNGE, B. A. Aetiology of diarrhoea in young calves. **Veterinary Record**, v. 119, n. 2, p. 31-34, 1986.

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)**. 2008. 71 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; MORAES, C. C. G.; MENESES, A. M. C.; VIANA, R. B.; LINS, F.; SANTOS, R. B.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Enteric coronavirus in adult water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Virus Reviews & Research**, v. 13. p. 121, 2008. Trabalho apresentado ao XIX National Meeting of Virology, Caxambu, MG, 2008a.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; BARROS, I. N.; AYRES, G. R.; PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. Genealogical studies of respiratory and enteric bovine coronavirus of Brazilian strains based on the partial analysis of the *S* and *HE* genes. **Virus Reviews & Research**, v. 14. p. 193, 2009. Trabalho apresentado ao XX National Meeting of Virology, Brasília, DF, 2009.

SOUZA, S. P.; ASANO, K. M.; VILLARREAL, L. Y. B.; SILVA, S. O. S.; RICHTZENHAIN, L. J.; BRANDAO, P. E. A semi-nested assay targeted to Coronavirus Bovine hemagglutinin-esterase gene as a basis for molecular epidemiology. **Virus Reviews & Research**, v. 13. p. 11, 2008. Trabalho apresentado ao XIX National Meeting of Virology, Caxambu, MG, 2008b.

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.; STIPP, D. T.; ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. 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 of Virological Methods**, v. 131, n. 2, p. 148-154, 2006.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

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, n. 10, p. 693-700, 1999.

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.

TYRRELL, D. A. J.; ALMEDIA, J. D.; BERRY, D. M.; CUNNINGHAM, C. H.; HAMRE, D.; HOFSTAD, M. S.; MALLUCI, L.; McINTOSH, K. Coronavirus. **Nature**, v. 220, p. 650, 1968.

VERHEIJE, M. H.; HAGEMEIJER, M. C.; ULASLI, M.; REGGIORI, F.; ROTTIER, P. J. M.; MASTERS, P. S.; DE HAAN, C. A. M. The coronavirus nucleocapsid protein is dynamically associated with the replication-transcription complexes. **Journal of Virology**, v. 84, n. 21, p. 11575-11579, 2010.

YAMADA, Y. K.; TAKIMOTO, K.; YABE, M.; TAGUCHI, F. Acquired fusion activity of murine coronavirus MHV-2 variant with mutations in the proteolytic cleavage site and the signal sequences of the S protein. **Virology**, v. 227, n. 1, p. 215-219, 1997.

YE, Y.; HOGUE, B. G.; Role of the coronavirus E viroporin protein transmembrane domain in virus assembly. **Journal of Virology**, v. 81, n. 7, p. 3597-3607, 2007.

YOKOI, K.; OKAZAKI, H.; INAHARA, K.; HATAMA, S. Prevalence of eight bovine viruses in sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) in Japan. **Veterinary Record**, v. 165, n. 25, p. 754-755, 2009.

ZHANG, J.; GUY, J. S.; SNIJDER, E. J.; DENNISTON, D. A.; TIMONEY, P. J.; BALASURIYA, U. B. R. Genomic characterization of equine coronavirus. **Virology**, v. 369, n. 1, p. 92-104, 2007.

ZHANG, X.; HERBST, W.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Comparison of the S genes and the biological properties of respiratory and enteropathogenic bovine coronaviruses. **Archives of Virology**, v. 134, n. 3-4, p. 421–426, 1994.

ZIEBUHR, J.; SNIJDER, E. J.; The coronavirus replicase gene: special enzymes for special viruses. In: THIEL, V. **Coronaviruses**: molecular and cellular biology. Norfolk: Caister Academic, 2007. p. 33-63.