MARCIO PINOTTI GUIRAO

Sobre a ocorrência e a genealogia de amostras brasileiras de Coronavírus canino (CCoV) e o papel de cães como reservatórios para rotavírus

São Paulo

2009

MARCIO PINOTTI GUIRAO

Sobre a ocorrência e a genealogia de amostras brasileiras de Coronavírus canino (CCoV) e o papel de cães como reservatórios para rotavírus

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

São Paulo

2009

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2185
FMVZ

Guirao, Marcio Pinotti
Sobre a ocorrência e a genealogia de amostras brasileiras de Coronavírus canino (CCoV) e o papel de cães como reservatórios para rotavírus / Marcio Pinotti Guirao. – 2009.
49 f. : il.

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

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão.

1. Cães. 2. Coronavírus. 3. Genealogia. 4. Rotavírus. I. Título.

ERRATA

GUIRAO, M. P. **Sobre a ocorrência e a genealogia de amostras brasileiras de *Coronavirus canino* (*CCoV*) e o papel de cães como reservatórios para Rotavirus.** 2009. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Folha	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia-se
RESUMO	2º	4ª	2009 Dissertação	2009. 49 f. Dissertação
ABSTRACT	2º	4ª	57 f.	49 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Rotavírus e coronavírus canino (CCoV) em cães jovens: estudo de freqüência de ocorrência, diversidade molecular de CCoV e papel dos cães como reservatórios para rotavírus", protocolado sob o nº1355/2008, utilizando 100 (cem) cães, 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 na reunião do dia 18 de junho de 2008.

We certify that the Research "Rotavirus and canine coronavirus (CCoV) in young dogs: study on the frequency of occurrence, molecular diversity of CCoV and the role of dogs as rotavirus reservoirs", utilizing 100 (one hundred) dogs, protocol number 1355/2008, 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 06/18/08.

São Paulo, 19 de junho de 2008

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Univrsitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone/Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
+ 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GUIRAO, M. P.

Título: Sobre a ocorrência e a genealogia de amostras brasileiras de Coronavirus canino (CCoV) e o papel de cães como reservatório para rotavírus

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

Data: ___/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Aos meus queridos pais Antonio e Arlete e meus irmãos Fabio e Tatiana.

Alegrei-me sobremaneira no Senhor porque, agora, uma vez mais, renovastes a meu favor o vosso cuidado: o qual também já tínheis antes, mas vos faltava oportunidade.

Digo isso, não por causa da pobreza, porque aprendi a viver contente em toda e qualquer situação.

Tanto sei estar humilhado, como também ser honrado; de tudo e em todas as circunstancias já tenho experiência, tanto de fartura, como de fome; assim de abundancia, como de escassez; tudo posso naquele que me fortalece.

Todavia fizestes bem, associando-vos na minha tribulação. E sabeis também vós, ó filipenses, que no inicio do evangelho, quando parti da Macedônia, nenhuma igreja se associou comigo, no tocante a dar e receber, senão unicamente vós outros; porque até para Telassonica mandastes não somente uma vez, mas duas, o bastante para as minhas necessidades.

Não que eu procure o donativo, mas o que realmente me interessa é o fruto que aumente o vosso credito.

Recebi tudo, e tenho abundancia; estou suprido, desde que Epafrodito me passou às mãos o que me veio de vossa parte, como aroma suave, como sacrifício aceitável e aprazível a Deus.

E o meu Deus, segundo a sua riqueza em gloria, há de suprir em Cristo Jesus, cada uma de vossas necessidades.

Ora, a nosso Deus e Pai sejam a gloria pelos séculos dos séculos.

Filipenses1, 4:10-20

AGRADECIMENTOS

Ao Deus criador, por sustentar-me e manter-me forte diante das dificuldades, por sua proteção durante toda a realização do meu mestrado, por Ele ser a minha esperança e sempre me ajudar, firmando meus passos e mostrando o caminho quando me sentia perdido e inseguro,

A Jesus Cristo por seu imenso amor sempre direcionado a mim, me ouvindo e me acalmando nos momentos de angustia, sem tirar seus olhos de mim.

Aos meus pais Antonio e Arlete por seu amor, carinho, dedicação, compreensão, pelo apoio emocional durante os momentos de duvida, pelo suporte financeiro, sem o qual seria impossível a realização deste sonho.

Aos meus irmãos Fabio e Tatiana, por seu amor carinho, compreensão e afeto durante o meu mestrado.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, pela orientação, pela amizade, pela preocupação e dedicação com o meu desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Leonardo Jose Richtzenhain, pela amizade, por suas aulas serem tão prazerosas e por suas sabias palavras.

Ao Prof. Dr. Jose Antonio Jerez, pela amizade, dedicação e atenção.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares, pela amizade e respeito, exemplo de cientista a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, pela amizade, atenção, por me receber tão bem no laboratório de doenças parasitárias e por suas piadas e seu bom humor que tornavam a rotina mais leve.

A Profª. Drª. Solange Maria Gennari, pela amizade, carinho e consideração durante todo o período que estive na USP, desde o estagio até o mestrado.

A Profª. Drª. Simone Balian, pela amizade, carinho e gentileza que dedicou a mim

A Profª. Drª. Evelise, pela amizade e pelas aulas tão enriquecedoras.

Ao Prof. Dr. José Soares Ferreira Neto, pelo respeito e cordialidade que sempre despendeu a mim.

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias, pela amizade, respeito e cordialidade que são sua marca registrada.

Ao Prof. Dr. Fumio Honma, por sua amizade, atenção e dedicação no ensino da Epidemiologia.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos, pela amizade, dedicação e pela ajuda nos casos de Leptospirose dos meus pacientes.

A Profª. Drª. Sonia Pinheiro, pela amizade, carinho, dedicação e por me ajudar nas amostras da aldeia indígena.

Ao Prof. Dr. Nilton Abreu Zanco, por sua amizade e incentivo desde os tempos de faculdade e exemplo de profissional a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Celso Martins Pinto, pela nossa amizade desde os meus primeiros passos na medicina veterinária sempre se mostrando um excelente mestre, amigo, professor. Pelos conselhos e sugestões, sempre corretos e certeiros, um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Milton Kolber, pela amizade e carinho que sempre teve por mim durante a minha formação de medico veterinário, um excelente professor e amigo, pelas grandes conversas e conselhos que eu levo para a vida, um referencial para mim.

Ao Prof. Antero e aos funcionários do Hospital Veterinário da Universidade Metodista de São Paulo, pela amizade e pela preocupação em ajudar na realização deste projeto.

As integrantes do projeto G.A.M.A. por me ajudar tanto na realização deste projeto, sem a qual seria impossível concluí-lo.

Aos diretores do Hospital Veterinário Saúde Animal, Dr. Daniel, Dr. Valter Yoshio e Dr. Valter Hato, pela amizade e compreensão durante o tempo que trabalhei lá.

A Dr. Wanda Foguel Doratiotto e sua família, pela amizade, compreensão, incentivo no meu mestrado, pela paciência e atenção.

A Sheila Oliveira de Souza Silva, por sua amizade, ajuda e eficiência.

Ao Pedro César Ferreira da Silva, pela sua amizade e bom humor.

Ao Renato Caravieri, por sua amizade, respeito e ajuda durante o meu mestrado.

Ao Alexandre Abelardo Sanches por sua dedicação, amizade, respeito, eficiência, atenção e consideração. Pela paciência que teve em me ensinar e ajudar com as PAGEs, pela sua incansável preocupação em realizar um trabalho perfeito, não importando se teria que repetir mais de uma vez o exame e nem se importando em sair mais tarde do que seu horário normal. Um excelente profissional que mesmo com seu conhecimento e experiência mantém a humildade e está sempre disposto a ajudar a todos. Um exemplo a ser seguido.

A Sandra Abelardo Sanches, pela amizade, carinho, respeito e atenção, sempre me apoiando e incentivando.

A todos os funcionários da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice, em especial a Elena Aparecida Tanganini, Maria de Fátima, e Elza por toda dedicação e ajuda durante meu mestrado.

A Guaciara Tenório Cavalcante e a Patrícia, pela amizade e ajuda no experimento.

Ao Enio Mori, pela amizade, respeito e paciência em me ensinar e me envolver com o mundo da pesquisa científica dos vírus.

A Alessandra Marnie Martins Gomes de Castro, pela amizade, respeito e carinho com que sempre me tratou durante meu mestrado.

A Adriana Cortez, por sua amizade, atenção, por estar sempre disposta a me ensinar e aconselhar.

A Karen Miyuki Asano, companheira de bancada, minha irmã cientifica, parceira de PCR e eletroforese, pela amizade, carinho, respeito e bom humor durante todo o tempo do mestrado.

A Estella Gallucci Lopes, Juliana Martins, Mikaela Renata Funada, Patricia de Oliveira Esmerini, Carlos Augusto Scacchetti de Almeida, pela amizade e apoio.

A Gisele Ayres Razera, companheira de bancada, minha irmã cientifica, pela amizade, carinho, respeito e suas palavras sabias e confortantes.

A Sibele Pinheiro de Souza, por sua amizade e disposição em me ajudar sempre.

A Thaisa Lucas Sandri, por sua amizade, atenção e ajuda.

A Vanessa Riesz Salgado, por suas conversas, bom humor e disposição no laboratório.

Ao Naason e ao André Lee, pela amizade, bom humor e longas conversas.

A Juliana Vasconcellos, por sua amizade, carinho, respeito e longas conversas.

Ao Richard Pacheco, pela amizade.

Ao Thiago Fernandes Martins, por sua amizade e consideração.

A Fernanda Nieri, por sua amizade e bom humor.

Ao Jonas de Moraes Filho, por sua amizade e suas piadas sempre em boa hora.

Ao João Fabio Soares, por sua amizade, respeito e suas conversas.

Ao técnico Aduilson Alves Costa, pela sua ajuda, dedicação e respeito.

A Jucelia de Jesus Pereira, Flavia Carolina Souza de Oliveira e Adriana Pinheiro da Franca, pela amizade e ajuda.

RESUMO

GUIRAO, M. P. **Sobre a ocorrência e a genealogia de amostras brasileiras de *Coronavírus canino* (*CCoV*) e o papel de cães como reservatórios para Rotavírus.** [On the occurrence and genealogy of Brazilian strains of *Canine coronavirus* (*CCoV*) and the role of dogs as reservoirs for rotavirus].2009 Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Gastrenterites virais em cães são doenças transmissíveis infecciosas com importância para a saúde animal, como as causadas por *Parvovírus canino* e *Coronavírus canino* (CCoV) e saúde pública, como no caso dos rotavírus. Rotavírus em cães são encontrados com baixa freqüência, tanto em cães com diarréia quanto sadios, mas sua importância como reservatório para a rotavirose humana já é conhecido. O *CCoV*, pertencente ao grupo 1 do gênero *Coronavirus*, ocorre sob a forma dos genótipos I e II, amplamente distribuídos mundialmente e implicados em diarréia moderada, mas podendo levar a elevada letalidade no caso de patótipos altamente patogênicos. No Brasil, a ocorrência de rotavírus do sorogrupo A em cães é um fato conhecido, mas, no caso do *CCoV*, existe, até o momento, apenas uma investigação relatando sua ocorrência, sem dados de diversidade molecular. A presente investigação teve por objetivos avaliar o papel de cães jovens com enterite sintomática, bem como sadios, como reservatórios de rotavírus, estudar a freqüência de ocorrência de *Coronavírus canino* (*CCoV*) em amostras fecais destes animais e estudar a diversidade molecular das amostras de *CCoV* encontradas. Para tato foram colhidas 100 amostras fecais de cães não vacinados, entre 1 e 180 dias de idade entre 2007 e 2008, sendo 50 com diarréia e 50 sem diarréia no momento da colheita, nos Municípios de São Paulo, São Bernardo do Campo, Santo André, São Caetano do Sul, Taboão da Serra, Itapecerica da Serra e uma aldeia indígena em Parelheiros. Às amostras foi aplicada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) para a detecção de rotavírus e uma RT-PCR dirigida ao gene da proteína de membrana M do *CCoV* (nucleotídeos 337 a 746) para a detecção deste vírus, sendo os fragmentos detectados submetidos a seqüenciamento de DNA. As seqüencias obtidas, traduzidas em aminoácidos, foram utilizadas para a construção de uma árvore genealógica enraizada de distância com o algoritmo Neighbor-Joning e

modelo de Poisson com 100 repetições de bootstrap. Nenhuma das amostras resultou positiva para rotavirus, enquanto que 47 foram positivas para CCoV, com freqüência significativamente superior nos animais com diarréia. Vinte e dois dos 47 fragmentos de DNA obtidos resultaram em seqüências viáveis de DNA, sendo 12 classificadas como CCoV Tipo I e 10 como Tipo II, tendo sido encontrada uma sublinhagem exclusivamente brasileira para o Tipo II. Em relação à amostra vacinal de *CCoV* submetida ao seqüenciamento de DNA, a maior identidade ocorreu com o grupo Tipo II sublinhagem 01, com um valor de 100%, seguido de 97,2% para o Tipo II sublinhagem 02 (a linhagem brasileira) e 93,2% para o Tipo I. Sugere-se que a diversidade de *CCoV* encontrada seja derivada da elevada freqüência de ocorrência deste vírus, o que pode aumentar a probabilidade de divergências e de possíveis falhas vacinais por diferenças entre a amostra vacinal (Tipo II) e as amostras de campo (Tipos I e II), e, dessa forma, a vacina não diminuiria a transmissão e novas linhagens de CCoV emergiriam. Conclui-se que cães jovens com enterite sintomática, bem como sadios, não tiveram papel como reservatório para rotavírus, considerando-se a região geográfica e o período de colheita de amostras. O *CCoV* ocorreu com uma freqüência de 47% na população canina estudada, com freqüência estatisticamente significativamente superior naqueles com diarréia do que naqueles sem diarréia. Finalmente, amostras brasileiras de *CCoV*, com base em seqüenciamento parcial do gene codificador da proteína de membrana M, ocorrem tanto como tipo I quanto II, sendo que, para o tipo II, há uma lihangem tipicamente brasileira.

Palavras-chave**:** Coronavírus. Rotavírus. Cães. Genealogia.

ABSTRACT

GUIRAO, M. P. **On the occurrence and genealogy of Brazilian strains of *Canine coronavirus* (*CCoV)* and the role of dogs as reservoirs for rotavirus.** [Sobre a ocorrência e a genealogia de amostras brasileiras de *Coronavírus canino* (*CCoV*) e o papel de cães como reservatórios para rotavírus]. 2009. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Viral canine gastroenteritis is infectious transmissible diseases with importance for animal health, as those caused by *Canine parvovirus* and *Canine coronavirus* (*CCoV*) and public health, as in the case of rotavirus. Canine rotavirus occurs at low frequencies, both in diarrheic and health dogs, but the importance of dog as reservoirs for human rotaviruses is known. *CCoV* belongs to group 1 of the genus *Coronavirus* and occurs as genotypes I and II, worldwide distributed and implicated in mild diarrhea, but high pathogenic types might lead to high lethality. In Brazil, the occurrence of serogroup A rotavirus in dogs is already known but, in the case of *CCoV*, there's a single report on the occurrence of this virus, with no data on its molecular diversity. The aims of the present investigation were to evaluate the roles of diarrheic and health young dogs as reservoirs of rotavirus, to study the occurrence of *CCoV* in these animals and to assess the molecular diversity of the strains found. One hundred fecal samples were collected from unvaccinated dogs between 2007 and 2008 (50 with diarrhea and 50 health dogs) in the Municipalities of São Paulo, São Bernardo do Campo, Santo André, São Caetano do Sul, Taboão da Serra, Itapecerica da Serra and in an indian community in Parelheiros. The samples were submitted to polyacrilamide gel electrophoresis (PAGE) for rotavirus detection and to an RT-PCR targeted to the membrane M protein gene (nucleotides 337 to 746) of *CCoV* for the detection of this virus; amplicons were then submitted to DNA sequencing and the putative amino acids sequences were used to build a rooted distance genealogic tree with the Neighbor-Joinng algorithm and he Poisson correction with 1,000 bootstrap replicates. No sample was positive to rotavirus, while 47 out of the 100 samples were positive for *CCoV*, with a statistically significative higher frequency for the dogs with diarrhea. Twenty-two out of the 47 ampicons resulted in viable sequences, being 12 classified as CCoV Type II and 10 as Type I;

besides, and exclusively Brazilian sub lineage was found for Type II. Regarding the vaccine strain, the highest identity was found to Type II sub linage 02 (10%), followed by 97.2% for Type II sub linage II (the Brazilian sub linage) and 93.2% for Type I. It's suggested that the high diversity for *CCoV* detected is a consequence of the high frequency of occurrence of this virus, what might increase the probability of the emergence of divergence and possible vaccine failures due to differences amongst the vaccine strain (Type II) and field strains (Types I and II) and thus vaccination would not decrease the transmission and new lineages would emerge. It can be concluded that both health and diarrheic young dogs have played no role as reservoirs for rotavirus taking into account the geographic area and the time of samples collection. *CCoV* ocurred at a frequecy of 47%, with a higher frequency in the diarreic animals. Finally, Brazilian strains of *CCoV*, based on partial M gene sequences, occur as both type I and II, while, for Type II, a typical Brazilian lineage was described.

Keywords: Coronavirus. Rotavirus. Dogs. Genealogy.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Min.	minuto por hora
%	por cento
BLAST/n	Basic Local Alignment Search Tool
CCoV	coronavírus canino
^{o}C	graus Celsius
cDNA	DNA complementar
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DEPC	dietil-pirocarbonato
et al.	e colaboradores
g	aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s^2)
kDa	quilodalton
M	Molar
mM	milimolar
ng	nanogramas
mL	mililitro
µL	microlitro
µg	micrograma
ORF	open reading frame
Pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pmol	picomoles
RNA	acido nucléico
RT	transcrição reversa
U	unidade internacional

SUMARIO

1 **INTRODUÇÃO**.....16
2 **OBJETIVOS.**.....20
3 **MATERIAIS E MÉTODOS**.....21
3.1 AMOSTRAS DE CAMPO.....21
3.2 AMOSTRAS VIRAIS DE REFERENCIA.....22
3.3 PESQUISA DE ROTAVIRUS UTILIZANDO A ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).....22
3.3.1 **Extração de RNA**.....22
3.3.2 **Eletroforese em gel de poliacrilamida**.....23
3.4 PESQUISA DE CORONAVIRUS CANINO.....23
3.4.1 **Extração de RNA**.....24
3.4.2 **Transcrição reversa-reação em cadeia pela polimerase para detecção do gene codificador de proteína de membrana M**.....24
3.5 GENEALOGIA DO CORONAVIRUS CANINO.....25
3.5.1 **Reação de seqüenciamento de DNA**.....25
3.5.2 **Edição de seqüências**.....26
3.5.3 **Analise genealógicas**.....26
3.5.4 **Identidades de aminoácidos**.....36
3.6 ANALISE ESTATISTICA.....37
4 **RESULTADOS**.....28
4.1 PESQUISA DE ROTAVIRUS UTILIZANDO A ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....28
4.2 PESQUISA DE CORONAVIRUS CANINO.....28
4.3 ANALISE GENEALÓGICA DO CORONAVIRUS CANINO.....30
4.4 IDENTIDADE DE AMINOACIDOS.....37
5 **DISCUSSÃO**.....38
6 **CONCLUSÕES**.....44
REFERENCIAS.....45

1 INTRODUÇÃO

Vírus enterotrópicos em cães são comumente detectados em animais jovens em todo o mundo, sendo aqueles pertencentes aos gêneros *Parvovirus*, *Coronavirus* e *Rotavirus* aqueles sobre os quais grande parte das investigações tem se dedicado, tanto em função de sua participação na etiologia de gastrenterites caninas quanto de seu potencial zoonótico, como no caso dos últimos.

Os rotavírus, pertencentes ao gênero *Rotavirus*, família *Reoviridae*, são vírus não-envelopados, com um capsídeo protéico em 3 camadas, apresentando genoma constituído por RNA de fita dupla (dsRNA) em 11 segmentos, cada segmento codificando para, pelo menos, uma das proteínas virais (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Os onze segmentos de dsRNA são alocados no interior do "core" (ou núcleo) glicoprotéico, constituído pelas proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3; acima do "core" encontra-se um capsídeo de camada dupla, também de natureza glicoprotéica, sendo que as glicoproteínas do capsídeo interno (VP6) permitem a classificação em sorogrupos ou espécies virais de A a G, distinguíveis por eletroferótipos característicos, e as do externo (VP4 e VP7) em sorotipos; tais sorotipos são classificados pelas letras G (glicoproteína) quando a classificação é feita considerando-se a VP7 ou P (protease-sensível), quando se considera a VP4 (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Em cães, é conhecido o papel dos rotavírus do sorogrupo A em enterites suaves ou mesmo subclínicas, de maior freqüência em animais abaixo de duas semanas de idade, os quais podem apresentar sintomas outros como anorexia e vômito (POLLOCK; CARMICHAEL, 1990; MOCHIZUKI et al., 2001).

Paralelamente, inquéritos soro epidemiológicos demonstraram uma elevada freqüência de ocorrência de anticorpos anti-rotavírus em cães adultos (MOCHIZUKI et al., 1986), o que significa que estes animais são continuamente expostos à infecção por rotavírus e, ainda que não apresentem diarréia, podem albergar o vírus em seu epitélio intestinal e transmiti-lo a outros susceptíveis, incluindo o homem.

No Brasil, é conhecida a ocorrência de rotavírus tanto em cães com diarréia (GABBAY et al., 2003) quanto em adultos assintomáticos (RUIZ et al., 2009), mas não há estudos focados na avaliação do papel dos cães na Saúde Pública em relação às rotaviroses.

Em seres humanos, os rotavírus são a principal causa de gastroenterite aguda severa, resultando em morbidade e mortalidade significativas, responsáveis por 20 a 70% dos casos de diarréia que demandam hospitalização e 20% do total de mortes por diarréia em crianças abaixo de 5 anos de idade mundialmente, sendo, atualmente, alvo de intensa campanha de vacinação por parte do Ministério da Saúde do Brasil, com um custo anual de, aproximadamente, R$ 121.520.000,00.

Ainda que os rotavírus apresentem algum grau de espécie-especificidade em função da baixa replicação viral em tecidos de hospedeiros não-específicos, rotavírus de diversas espécies podem infectar humanos e nestes causar gastrenterite sempre quando há alguma probabilidade de transmissão zoonótica (PALOMBO et al., 2002; COOK et al., 2004), havendo a emergência de novos tipos de rotavírus em humanos tanto pela transmissão de vírus “inteiros” quanto pelos rearranjos genéticos entre diferentes rotavírus (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

A transmissão de rotavírus entre cães e humanos é um fato já demonstrado tanto experimentalmente (TZIPORI; MAKIN, 1978) quanto de modo natural (NAGAKOMI et al., 1992), podendo rotavírus caninos ser isolados mesmo de humanos assintomáticos (NAGAKOMI; NAGAKOMI, 2000).

Além disso, sabe-se que há associação entre a posse de cães e a infecção por rotavírus em pacientes humanos com diarréia, podendo os cães servir como carreadores dos vírus na superfície externa de suas patas e focinhos (ENGLEBERG et al., 1982) ou, mais importante, como reservatórios de rotavírus em infecção intestinal (LAIRD et al., 2001).

Para o diagnóstico laboratorial de rotavírus, a técnica mais utilizada é a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), na qual se busca evidenciar a presença dos 11 segmentos de RNA dos rotavírus diretamente de extratos de RNA de amostras fecais (HERRING et al., 1982), sendo esta uma técnica de alta especificidade analítica, que permite, além da identificação do rotavírus, a determinação do sorogrupo/ espécie em questão em função do padrão de migração das bandas de RNA (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

Diversamente à rotavirose, a coronavirose entérica canina, causada pelo *Coronavírus canino* (*CCoV*), é uma doença infecciosa de distribuição mundial que ocorre de forma endêmica e que leva a elevadas morbidade e mortalidade em cães jovens, sendo que dois genótipos, *CCoV* tipo 1 e *CCoV* tipo 2, são conhecidos (PRATELLI et al., 2004; PRATELLI et al., 2006).

Os coronavírus são classificados na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, a qual compreende os gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*. Na mesma ordem, encontram-se também as famílias *Arteriviridae* e *Roniviridae* (GONZÁLEZ et al., 2003).

O gênero *Coronavirus* é ainda subdividido em três grupos (1, 2 e 3) definidos por epítopos presentes nas glicoproteínas de envelope, seqüências de nucleotídeos e hospedeiros naturais, sendo o *Coronavírus canino* classificado no grupo 1 (HOLMES; LAI, 1996).

Além da espécie Coronavirus canino, uma segunda espécie, denominada de Coronavírus respiratório canino (CRCoV), foi relatada causando processos respiratórios em cães, tendo sido classificada no grupo 2 dos coronavírus (ERLES et al., 2003)

O coronavírus canino é um vírus envelopado, pleomórfico, aproximadamente arredondado com até 220nm de diâmetro, com quatro proteínas estruturais: proteína de nucleocapsídeo N, proteína de matriz M, proteína de envelope E e proteína de espícula S (MASTERS, 2006).

O genoma é constituído por um RNA de fita simples não-segmentado de sentido positivo com 27 kb, com nucleocapsídeo de simetria helicoidal em associação com a nucleoproteína N (HOLMES; LAI, 1996; MASTERS, 2006).

Quanto ao envelope, o mesmo é formado por uma camada dupla de lipídios com as proteínas estruturais M, E e S dela se projetando, resultando no aspecto de uma coroa (do latim *corona*) (HOLMES; LAI, 1996).

A principal proteína estrutural de envelope dos coronavírus é a proteína S, a qual forma projeções de 20nm de comprimento, sendo responsável pela atividade hemaglutinante e o principal alvo para anticorpos neutralizantes (COLLINS et al., 1982).

Em cães neonatos, o CCoV replica-se primariamente na extremidade dos vilos do intestino delgado, causando uma infecção lítica seguida por descamação e encurtamento dos vilos e diarréia em 18 a 72 horas pós-infecção (APPEL, 1987). Além disso, já foi demonstrado que o CCoV potencializa dramaticamente a severidade de infecções por parvovírus canino (PRATELLI et al., 1999b).

Ainda que o CCoV seja associado a infecções restritas ao trato entérico, variantes do vírus denominadas de pantrópicas, por apresentarem tropismo por pulmões, rins, fígado, baço e linfonodos, podem, causar surtos epidêmicos com elevada mortalidade em cães jovens (BUONAVOGLIA et al., 2006).

Para o Brasil, até o momento, apenas uma única uma investigação foi relatada sobre a ocorrência de coronavírus canino em cães (MOSCA, 2003), tendo sido encontrado um total de 55 amostras de animais positivos de um total de 80 testados (68,8%).

Pelo exposto, fica claro que o CCoV tem importância na etiologia da enterite em cães jovens, podendo potencializar a patogenia de outros vírus quando em co-infecção, agravando a severidade da diarréia nestes animais. Se sua associação com rotavírus, a qual, em função deste sinergismo, poderia levar a uma maior excreção deste último e conseqüente maior probabilidade de transmissão zoonótica, permanece incógnito.

Ainda, considerando-se as gastrenterites caninas, ao mesmo tempo em que proprietários, clínicos veterinários e a indústria veterinária levam a uma alta freqüência de vacinação, o conhecimento da ocorrência dos agentes infecciosos contra os quais se destinam tais vacinas ainda é escasso no Brasil, sobretudo em relação ao *Coronavírus canino*, o que pode resultar em falhas de proteção vacinal, levando a prejuízos econômicos por mortalidade e morbidade em cães, sobretudo em se considerando canis de produção comercial destes animais.

Assim, estudar a ocorrência de rotavírus e CCoV tanto em cães jovens com gastrenterite quanto sadios permite conhecer o papel dos cães como reservatórios para rotaviroses humanas, o impacto da associação entre estes dois patógenos sobre este papel e a diversidade molecular do CCoV no Brasil, contribuindo para o entendimento da cadeia epidemiológica das enterites virais e, por conseguinte, seu controle.

2 OBJETIVOS

A presente investigação foi dirigida pelos seguintes objetivos:

- Avaliar o papel de cães jovens com enterite sintomática, bem como sadios, como reservatórios de rotavírus, utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em amostras fecais dos mesmos.

- Estudar a freqüência de ocorrência de Coronavírus canino (CCoV) em amostras fecais de cães jovens com enterite sintomática, bem como em sadios, utilizando a técnica de transcrição reversa-reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

- Estudar a diversidade molecular das amostras de CCoV com base em seqüenciamento parcial do gene codificador da proteína de membrana M.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir, são descritos os materiais, equipamentos e métodos utilizados na presente investigação para o cumprimento dos objetivos.

3.1 AMOSTRAS DE CAMPO

Foram colhidas amostras fecais de 100 cães jovens, diretamente do reto, sendo 50 machos e 50 fêmeas, na faixa etária de 1 a 6 meses, sabidamente não vacinados contra a coronavirose canina.

Dessas 100 amostras, 50 eram de animais apresentando diarréia e 50 animais sem diarréia no momento da colheita, utilizando-se como definição de caso de diarréia a elevação na freqüência ou volume de evacuação ou a diminuição na consistência das fezes. apresentando fezes de consistência firme.

As amostras foram provenientes de clinicas veterinárias, canis, aldeia indígena e cães errantes, tendo sido colhidas nos anos de 2007 e 2008.

As cidades compreendidas neste estudo foram São Paulo, São Bernardo do Campo, Santo André, São Caetano do Sul, Taboão da Serra, Itapecerica da Serra e uma aldeia indígena em Parelheiros.

Para cada animal, foram avaliadas as seguintes variáveis:

1- Presença de gastrenterite no momento da colheita da amostras.

2- Idade.

3- Sexo.

4- Local de residência.

5- Possibilidade de acesso à rua.

6- Número de cães na residência.

7- Convivência com outras espécies de animais domésticos.

Todas as amostras foram mantidas a -20 ºC no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ- USP até o momento da preparação das amostras para o presente estudo.

No quadro 1, encontram descritas as amostras, tendo este quadro sido apresentado no item 4.3 em função da apresentação simultânea das características das amostras e dos resultados obtidos para a pesquisa viral.

As amostras fecais foram preparadas como suspensões a 20% (volume/volume) em água ultra-pura tratada com 0,1% de dietil-pirocarbonato (água DEPC) e clarificadas a 5.000 x g/ 15 minutos a 4 ºC, tomando-se os sobrenadantes como amostra, armazenando-se os mesmos a -20ºC até o momento dos testes.

3.2 AMOSTRAS VIRAIS DE REFERÊNCIA

Como controle positivo para coronavírus canino, foi utilizada a vacina comercial NOBIVAC® DHPPi + LC (Intervet Schering Plough Animal Health) e RECOMBITEK® (Merial).

Para rotavírus, foi utilizada a amostra NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Vírus, WHITE et al., 1970) mantida em células da linhagem MA-104 (rim fetal de macaco rhesus), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Antonio Jerez (VPS-FMVZ/USP).

3.3 PESQUISA DE ROTAVÍRUS UTILIZANDO A ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A pesquisa de rotavírus nas amostras fecais foi realizada utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) descrita por Herring et al. (1982) capaz de detectar todos os sorogrupos de rotavírus de conformidade com o perfil de migração eletroforética de dsRNA, com as modificações abaixo descritas.

3.3.1 Extração de RNA

Para a realização da técnica de PAGE, o RNA total foi extraído das suspensões fecais do controle positivo (amostra NCDV) e do controle negativo (água-DEPC) seguindo-se o protocolo abaixo:

- Homogeneizar em vórtex, durante 1 minuto, 400µL da suspensão fecal ou dos controles positivo ou negativo com 40µL de SDS a 10%, 40µL de acetato de sódio 1M e 400µL de álcool isoamílico/ clorofórmio/fenol pH 4,0 (1/24/37,5 v/v/v).
- Centrifugar a 12.000 g durante 2 minutos a 4ºC.
- Transferir o sobrenadante para outro tubo contendo 800µL de etanol absoluto a -20ºC.
- Incubar a -20ºC durante 18 horas.
- Centrifugar a 14.000 x g por 10 minutos a 4°C.
- Desprezar o sobrenadante e secar o excesso de etanol em papel de filtro.
- Ressuspender o pellet em 20µL de dissociador da amostra (SDS 0,3%, 2-Mercaptoetanol 0,5%, Glicerol 4% e Azul de bromofenol 0,0005%).
- Incubar durante 15 minutos a 56 ºC.

3.3.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

O RNA extraído (item 3.3.1) foi resolvido em eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo a 3,5%/7,5% sob corrente elétrica de 20 miliamperes durante 2,5 horas entre placas de vidro de 10 x 15 cm.

A seguir, o gel foi fixado em etanol 10%/ ácido acético 0,5% durante 30 minutos e corado com nitrato de prata 0,01M durante 30 minutos.

Finalmente, a coloração foi revelada com hidróxido de sódio 0,075M/ formaldeído 0,3% durante 15 minutos, observando-se o gel sob transiluminador de luz branca.

Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram 11 bandas de RNA em qualquer um dos 7 eletroferótipos correspondentes aos 7 grupos/ espécies de rotavírus (A, B, C, D, E, F e G) (ESTES; KAPIKIAN, 2007).

3.4 PESQUISA DE *CORONAVÍRUS CANINO*

3.4.1 Extração de RNA

Para a pesquisa de coronavírus canino, o RNA total foi extraído com TRIzol reagent (Invitrogen®), segundo as instruções do fabricante, a partir dos sobrenadantes das amostras de campo (item 3.1), da amostra vacinal (controle positivo) e a partir de água-DEPC (controle negativo).

3.4.2 Transcrição reversa-reação em cadeia pela polimerase para detecção do gene codificador da proteína de membrana M

A presença de CCoV foi pesquisada utilizando-se uma reação de transcrição reversa seguida por uma reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) descrita por Pratelli et al. (1999a), visando a amplificação de um segmento de 410 pares de bases (pb) (nucleotídeos 337 a 746) do gene codificador na proteína de membrana M do CCoV, seguindo-se o protocolo a seguir:

- Síntese de DNA complementar (c-DNA): Desnaturar 3,5µL do RNA extraído (item 3.4.1) a 95 ºC durante 5 minutos e adicioná-los à combinação de reagentes para a transcrição reversa contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada primer (CCV1 senso 5'TCCAGATATGTAATGTTCGG 3' e CCV2 anti-senso 5'TCTGTTGAGTAATCACCAGCT 3') e 100U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) em volume final de reação de 10µL, realizando-se a trancrição reversa a 42ºC/60min.
- Reação em cadeia pela polimerase: Após a obtenção do DNA complementar, foi realizada a reação de PCR pela adição de 5 µL de cada c-DNA à combinação de reagentes para PCR contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada primer (CCV1 e CCV2), 1,5mM $MgCl_2$, 25,25µL de água-DEPC e 1,25U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen™) para um volume final de reação de 50µL, seguindo-se desnaturação a 94º/ 4 min. e 35 ciclos de 94ºC/1 min.,

55ºC /1,5 min. e 72ºC/3 min., seguidos por 72ºC/10 min. para a extensão final.

Dez microlitros do produto de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídeo 0,5µg/mL e observado sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram a banda de 309 b.

3.5 GENEALOGIA DO CORONAVÍRUS CANINO

3.5.1 Reação de seqüenciamento de DNA

Inicialmente, os fragmentos de 410pb referentes ao gene M do CCoV foram purificados diretamente das reações de PCR, sem purificação a partir dos géis de agarose, com o *kit* Ilustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare).

A reação de seqüenciamento consistiu em 4 µL de BigDye 3.1 (Applied Byosystems™), 4 µL de 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems™), 4 pmol de cada *primer* senso e antisenso em reações separadas e 11,6 µL do DNA alvo para uma reação final de 20µL, levando-se ao termociclador PTC-200 (MJ Research ™) para 35 ciclos de 96ºC/30 segundos, 50ºC/15 segundos e 60ºC/4 minutos, com rampa de 0,7ºC/segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente de aproximadamente 25 ºC com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12.000 x g/ 25 min. a 25 ºC., removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g/5 min. a 25 ºC e secando-se o precipitado a 95 ºC/ min., ressuspendendo-se o *pellet* em formamida e levando-se as amostras ao seqüenciador automático ABI-377(Applied Biosystems™).

3.5.2 Edição de seqüências

Os cromatogramas gerados para cada uma das seqüências senso e antisenso de cada amostra foram submetidos ao aplicativo Phred *online* em http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/ para avaliação da qualidade dos mesmos, utilizando-se apenas posições com escore superior a 20 (1 erro a cada 100 nucleotídeos).

A seqüência final de cada amostra foi obtida com o aplicativo Cap-Contig com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), sendo a mesma submetida ao BLASTn para confirmação do seqüenciamento em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/.

3.5.3 Análise genealógica

Para as seqüências putativas de aminoácidos para obtidas após a tradução das seqüências de nucleotídeos com o programa Bioedit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999), a árvore genealógica foi gerada após o alinhamento das mesmas, juntamente com seqüências homólogas do gene M de coronavírus canino recuperadas do Genbank, cujas seqüências encontram-se na figura 2, e de coronavírus bovino como grupo externo pelo método do CLUSTAL/W com a matriz BLOSUM62 com o programa Bioedit (HALL, 1999), obtendo-se a árvore enraizada de distância com o algoritmo Neighbor-Joining e modelo evolutivo de Poisson com 1000 repetições de bootstrap com o programa Mega 4 (TAMURA et al., 2007).

A decisão para a geração da árvore de aminoácidos ao invés de nucleotídeos deu-se em função da possibilidade da representação na árvore das distâncias devidas apenas a mutações não-sinônimas, de maior significado antigênico.

3.5.4 Identidades de aminoácidos

As identidades de aminoácidos mínima, máxima e média para os grupamentos de *CCoV* foram calculadas com o programa Excel (©1985-2003 Microsoft Corporation) a partir das identidades calculadas com o programa Bioedit.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das diferenças entre os números totais de cães positivos e negativos para rotavirus e coronavirus canino entre aqueles com e sem diarréia foi calculada pelo método de chi-quadradro corrigido de Mantel-Haenszel com p critico=0,05 e nível de confiança de 95%, utilizando-se o sitio http://statpages.org.

4 RESULTADOS

A seguir, apresentam-se os resultados derivados da aplicação dos materiais e métodos.

4.1 PESQUISA DE ROTAVÍRUS UTILIZANDO A ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Das 100 amostras testadas quanto à presença de rotavírus pela técnica de PAGE, nenhuma resultou positiva, uma vez que não foram encontrados segmentos de RNA nos géis.

Para a amostra NCDV de rotavírus incluída como controle positivo, foram observadas as 11 bandas de RNA arranjadas no eletroferótipo típico para rotavírus do grupo A (grupamentos de 4, 2, 3 e 2 bandas).

Por sua vez, no controle negativo (água-DEPC), não foram observadas quaisquer bandas.

4.2 PESQUISA DE CORONAVIRUS CANINO

De todas as 100 amostras fecais processadas no presente estudo, 47 foram positivas para a PCR dirigida ao gene M do *CCoV*, de acordo com o aparecimento da banda de 410pb, conforme a amostra vacinal de referência (controle positivo), sendo que, para os controles negativos (água-DEPC) nenhuma banda foi detectada. A figura 1 apresenta exemplos de reações de RT-PCR positivas para o fragmento de 410pb do gene M do *CCoV*.

Destas 47 amostras positivas, 26 eram de filhotes machos e 21 eram de filhotes fêmeas.

Quanto a faixa etária, 9 filhotes tinham 30 dias de vida, 6 filhotes tinham 40 dias de vida, 1 filhote tinha 45 dias de vida, 21 filhotes tinham 60 dias de vida, 5 filhotes

tinham 90 dias de vida, 1 filhote tinha 120 dias de vida, 3 filhotes tinham 150 dias de vida e 1 filhote tinha 180 dias de vida.

Os resultados para a pesquisa de *CCoV* encontram-se sumarizados no Quadro 1.

Entre os 50 cães com gastrenterite, 31 foram positivos para a presença de *CCoV*, enquanto que, para os sadios, este número foi de 16.

Comparando-se o número de positivos entre os cães sadios e cães com gastrenterite, o mesmo foi significativamente maior entre os cães com gastrenterite (p=0,003).

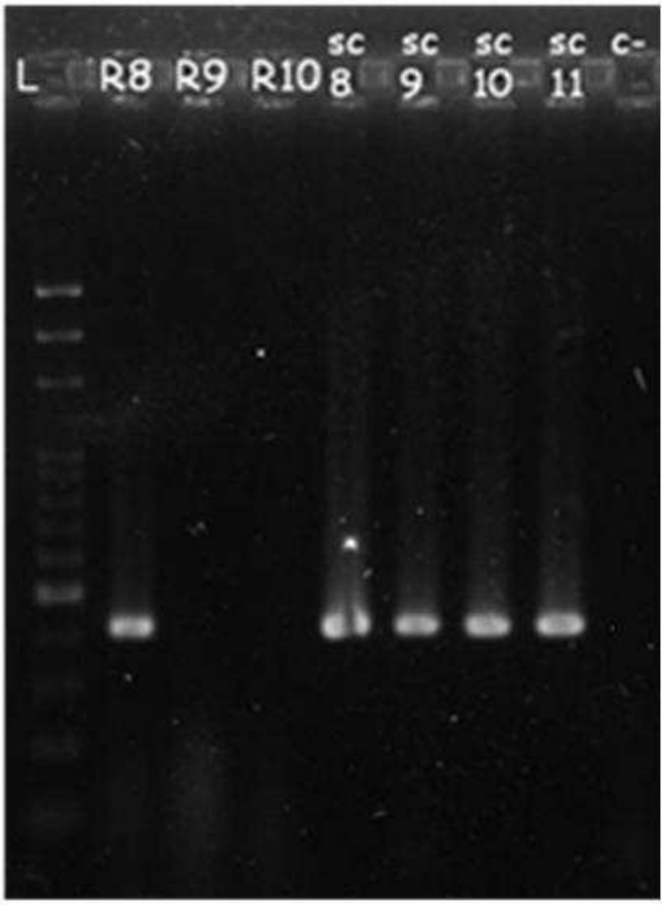

Figura 1-Fotografia de gel de eletroforese em agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo apresentando exemplos de reações positivas (banda de 410 pares de bases) e negativas (ausência de bandas) para o gene codificador da proteína de membrana N de Coronavírus canino (CCoV) após aplicação e amostras fecais de cães. L= padrão de tamanhos moleculares de DNA de 100 pares de bases; R8 a R10, SC8 a SC11: reações referentes a amostras fecais identificadas com os mesmos códigos; C-= reação referente ao controle negativo (água-DEPC)- São Paulo, 2009

4.3 ANÁLISE GENEALÓGICA DE CORONAVÍRUS CANINO

Das 47 amostras positivas para ao RT-PCR para coronavírus canino cujos fragmentos de DNA amplificados foram submetidos a seqüenciamento de DNA, 22 resultaram em seqüencias com escore phred acima de 20 e em contigs, enquanto que, para as demais 25, não foram obtidas sequências tanto em função dos baixos escores quanto de falhas em um dos dois sentidos seqüenciados.

A árvore filogenética para as posições de aminoácidos 156 a 229 (relativas à seqüência de número de acesso GenBank AY704916.1 referente à amostra 1-71 de CCoV tipo II) resultaram em dois grupos principais de CCoV (Figura 2).

Em um dos grupos, segregaram 10 das amostras incluídas no presente estudo (amostras 15, 45, 2M, 1M, 27, 16, 44, 42, 34 e 43), bem como a amostra vacinal seqüenciada (vacina RECOMBITEK® Merial), nomeada na árvore como “Vacina CCoV“, em conjunto com as seqüências recuperadas do Genbank pertencentes ao tipo II de CCoV, nomeando-se este grupo como “CCoV Tipo II“, suportado por um valor de bootstrap de 74.

No grupo denominado de “CCoV Tipo I“ na figura 2, encontram-se agrupadas as outras 12 amostras (40, 7M, 6M, 41, 12, 14, 25, 8M, 4, 35, 38 e 11) para quais foram geradas seqüências, em conjunto com amostras do Genbank referentes a CCoV do tipo I, com um valor de bootstrap de 98, não tendo sido observados subgrupos para a topologia obtida.

Com relação ao grupo CCoV tipo II, nota-se que três amostras (42, 34 e 43) segregaram em um subgrupo dentro do tipo II dos coronavírus caninos, com um valor de bootstrap de 66, nomeando-se aqui este subgrupo como “CCoV Tipo II sublinhagem

02” e, em paralelo, a linhagem predominante no tipo II na topologia apresentada como “CCoV Tipo II sublinhagem 01“.

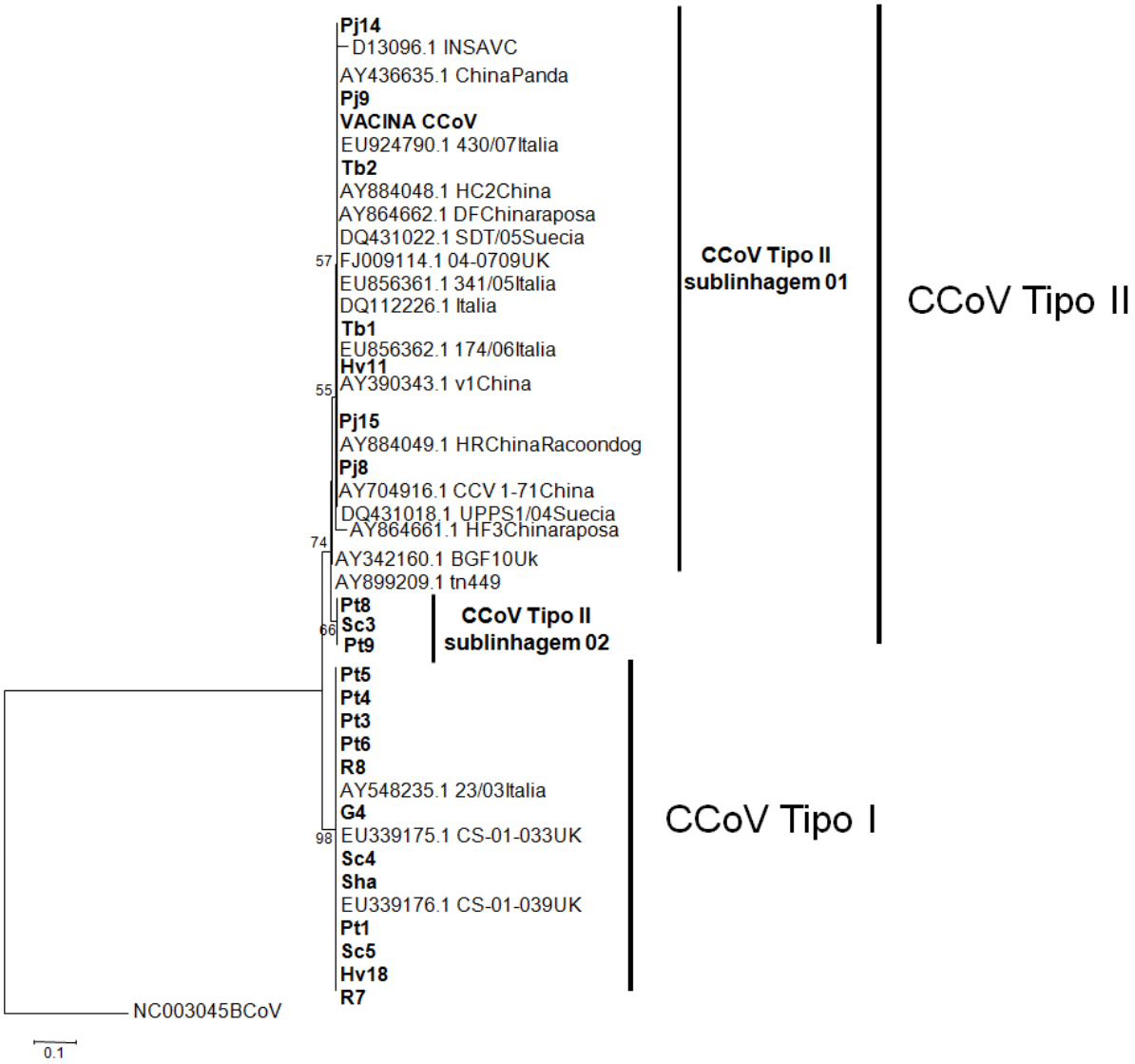

Figura 2- Árvore genealógica de distância construída com o algoritmo Neighbor-Joining e modelo evolutivo de Poisson para os aminoácidos 156 a 229 (relativas à seqüência AY704916.1) da proteína de membrana M de amostras de *Coronavírus canino* (*CCoV*) detectadas no presente estudo (em negrito), juntamente com seqüências homólogas recuperadas do Genbank, apresentando a subdivisão em Tipo I e Tipo II com as duas sublinhagens propostas no presente estudo. Os números acima de cada nó representam os valores de bootstrap (1000 repetições) a barra indica o n^{o} de substituições/sítio – São Paulo, 2009

Quadro1 Relação de amostras fecais de cães utilizadas no presente estudo para a pesquisa de Coronavírus canino (*CCoV*) e rotavírus com a identificação individual de cada uma (Am), local de colheita, presença ou ausência de gastrenterite (Ge), idade (em dias), sexo, tipo de habitação, possibilidade de acesso à rua, número de cães na residência e contato com outras espécies animais. As amostras sublinhadas foram positivas para *CCoV* e aquelas cuja identificação foi adicionada do símbolo I foram positivas para *CCoV* do grupo I e com II para *CCoV* do grupo II. Todas as amostras apresentadas neste quadro foram negativas para rotavírus, São Paulo, 2009

(Continua)

Am	**Local**	**Ge**	**Idade**	**Sexo**	**Residencia**	**Acesso a rua**	**Cães na residencia**	**Outras espécies**
1A	Parelheiros	não	30.	M	Oca	sim	5	gatos e aves
1B	Parelheiros	não	30	F	Oca	sim	5	gatos e aves
2A	Parelheiros	não	45	F	Oca	sim	7	gatos,aves, cavalos
3A	São Paulo	não	45	F	Casa	não	9	não
3B	São Paulo	não	45	F	Casa	não	9	não
3C	São Paulo	não	45	F	Casa	não	9	não
HV4	SBC	não	90	F	Escola	não	2	não
HV6	SBC	sim	90	F	Casa	não	1	não
HV7	SBC	sim	60	M	Casa	não	1	não
HV8	SBC	sim	60	F	Casa	não	1	não
HV9	SBC	sim	90	M	Casa	não	1	não
HV10	SBC	sim	60	M	Casa	não	1	não
HV11[II]	SBC	sim	90	M	Casa	não	1	não
HV12	SBC	sim	150	M	Casa	não	1	não
HV13	SBC	sim	150	M	Casa	não	1	não
HV14	SBC	sim	90	F	Casa	não	1	não
HV15	SBC	sim	60	F	Casa	sim	1	não
HV16	AS	não	60	M	Casa	não	1	não
HV17	SBC	não	30	M	Casa	não	1	não
HV18[I]	SBC	sim	60	F	Casa	não	1	Gatos e aves
HV19	SBC	sim	90	M	Casa	não	1	não

Quadro 1 Relação de amostras fecais de cães utilizadas no presente estudo para a pesquisa de Coronavírus canino (*CCoV*) e rotavírus com a identificação individual de cada uma (Am), local de colheita, presença ou ausência de gastrenterite (Ge), idade (em dias), sexo, tipo de habitação, possibilidade de acesso à rua, número de cães na residência e contato com outras espécies animais. As amostras sublinhadas foram positivas para *CCoV* e aquelas cuja identificação foi adicionada do símbolo I foram positivas para *CCoV* do grupo I e com II para *CCoV* do grupo II. Todas as amostras apresentadas neste quadro foram negativas para rotavírus, São Paulo, 2009

(Continua)

HV20	SBC	sim	45	M	Casa	não	1	não
HV21	SBC	não	90	F	Casa	sim	1	não
HV22	SBC	não	60	M	Casa	sim	1	não
SC1	SCS	sim	60	M	Canil	não	6	não
SC2	SCS	sim	60	M	Canil	não	6	não
SC3[II]	SCS	sim	30	F	Canil	não	6	não
SC4[I]	SCS	não	30	F	Canil	não	6	não
SC5[I]	SCS	não	60	M	Canil	não	6	não
SC6	SCS	não	90	M	Canil	não	6	não
SC7	SCS	sim	30	M	Canil	não	6	não
SC8	SCS	sim	90	F	Canil	não	6	não
SC9	SCS	sim	60	F	Canil	não	6	não
SC10	SCS	sim	60	M	Canil	não	6	não
SC11	SCS	sim	60	M	Canil	não	6	não
Laf	São Paulo	sim	60	M	Casa	não	1	não
Cind	São Paulo	sim	60	F	Casa	não	1	NI
Shadoh[I]	São Paulo	sim	90	M	Canil	não	NI	não
Rocky	São Paulo	não	180	M	Casa	não	1	não
SA1	SA	sim	90	M	Canil	não	NI	não
SBC1	SBC	não	180	F	Canil	não	5	não
Usp1	São Paulo	sim	60	M	Canil	sim	2	não
Usp2	São Paulo	sim	60	M	Canil	sim	2	não
Pet1[I]	SBC	sim	40	M	Canil	não	6	Não

Quadro 1 Relação de amostras fecais de cães utilizadas no presente estudo para a pesquisa de Coronavírus canino (*CCoV*) e rotavírus com a identificação individual de cada uma (Am), local de colheita, presença ou ausência de gastrenterite (Ge), idade (em dias), sexo, tipo de habitação, possibilidade de acesso à rua, número de cães na residência e contato com outras espécies animais. As amostras sublinhadas foram positivas para *CCoV* e aquelas cuja identificação foi adicionada do símbolo I foram positivas para *CCoV* do grupo I e com II para *CCoV* do grupo II. Todas as amostras apresentadas neste quadro foram negativas para rotavírus, São Paulo, 2009

(Continua)

Pet2	SBC	sim	40	M	Canil	não	6	não
Pet3[I]	SBC	não	40	M	Canil	não	6	não
Pet4[I]	SBC	sim	40	F	Canil	não	6	não
Pet5[I]	SBC	sim	40	F	Canil	não	6	não
Pet6[I]	SBC	sim	40	F	Canil	não	6	não
Pet7	SBC	não	60	M	Canil	não	5	não
Pet8[II]	SBC	sim	60	M	Canil	não	5	não
Pet9[II]	SBC	sim	60	F	Canil	não	5	não
Pet10	SBC	sim	60	F	Canil	não	5	não
Pet11	SBC	sim	60	M	Canil	não	5	não
Cor	SBC	não	90	M	Rua	sim	7	não
Pret	SBC	sim	120	F	Rua	sim	7	não
Pati1	São Paulo	não	50	M	Casa	não	1	não
Pj1	SBC	não	60	F	Canil	não	20	não
Pj2	SBC	não	90	F	Canil	não	20	não
Pj3	SBC	não	120	F	Canil	não	20	não
Pj4	SBC	não	60	F	Canil	não	20	não
Pj5	SBC	não	60	M	Canil	não	20	não
Pj6	SBC	não	60	M	Canil	não	20	não
Pj7	SBC	não	60	M	Canil	não	20	não
Pj8[II]	SBC	não	60	M	Canil	não	20	não
Pj9[II]	SBC	não	60	F	Canil	não	20	não
Pj10	SBC	não	60	F	Canil	não	20	não

Quadro 1 Relação de amostras fecais de cães utilizadas no presente estudo para a pesquisa de Coronavírus canino (*CCoV*) e rotavírus com a identificação individual de cada uma (Am), local de colheita, presença ou ausência de gastrenterite (Ge), idade (em dias), sexo, tipo de habitação, possibilidade de acesso à rua, número de cães na residência e contato com outras espécies animais. As amostras sublinhadas foram positivas para *CCoV* e aquelas cuja identificação foi adicionada do símbolo I foram positivas para *CCoV* do grupo I e com II para *CCoV* do grupo II. Todas as amostras apresentadas neste quadro foram negativas para rotavírus, São Paulo, 2009

(Continua)

Pj11	SBC	não	60	F	Canil	não	20	não
Pj12	SBC	não	60	F	Canil	não	20	não
Pj13	SBC	não	60	M	Canil	não	20	não
Pj14^{II}	SBC	não	60	M	Canil	não	20	não
Pj15^{II}	SBC	sim	60	M	Canil	não	20	não
Pj16	SBC	sim	90	M	Canil	não	20	não
Pj17	SBC	sim	90	M	Canil	não	20	não
Pj18	SBC	não	60	M	Canil	não	20	não
Tb1^{II}	TB	sim	30	F	Rua	sim	3	Gatos e aves
Tb2^{II}	TB	sim	30	F	Rua	sim	3	Gatos e aves
Tb3	TB	sim	30	F	Rua	sim	3	Gatos e aves
Du1	SBC	sim	45	F	Casa	não	5	não
Du2	SBC	sim	45	F	Casa	não	5	não
Du3	SBC	sim	45	F	Casa	não	5	não
G1	São Paulo	sim	150	F	Canil	não	4	não
G2	São Paulo	sim	150	F	Canil	não	4	não
G3	São Paulo	não	150	F	Canil	não	4	não
G4^{I}	São Paulo	não	180	M	Canil	não	4	não
DL	São Paulo	não	60	M	Canil	não	5	não
DC	São Paulo	não	60	M	Canil	não	5	não
TL	São Paulo	não	60	F	Canil	não	5	não
TC	São Paulo	não	60	F	Canil	não	5	não
Nick	São Paulo	não	60	M	Canil	não	5	não

Quadro 1 Relação de amostras fecais de cães utilizadas no presente estudo para a pesquisa de Coronavírus canino (*CCoV*) e rotavírus com a identificação individual de cada uma (Am), local de colheita, presença ou ausência de gastrenterite (Ge), idade (em dias), sexo, tipo de habitação, possibilidade de acesso à rua, número de cães na residência e contato com outras espécies animais. As amostras sublinhadas foram positivas para *CCoV* e aquelas cuja identificação foi adicionada do símbolo I foram positivas para *CCoV* do grupo I e com II para *CCoV* do grupo II. Todas as amostras apresentadas neste quadro foram negativas para rotavírus, São Paulo, 2009

(Conclusão)

R1	IS	não	30	F	Canil	não	12	não
R2	IS	não	30	F	Canil	não	12	não
R3	IS	não	30	M	Canil	não	12	não
R4	IS	não	30	F	Canil	não	12	não
R5	IS	não	30	M	Canil	não	12	não
R6	IS	não	30	M	Canil	não	12	não
R7[I]	IS	sim	30	F	Canil	não	12	não
R8[I]	IS	sim	30	F	Canil	não	12	não
R9	IS	não	30	F	Canil	não	12	não
R10	IS	não	30	F	Canil	não	12	não

SA = Santo André
SBC = São Bernardo do Campo
SC = São Caetano do Sul
IS = Itapecerica da Serra
TBS = Taboão da Serra

4.4 IDENTIDADES DE AMINOÁCIDOS

Para a região de aminoácidos considerada da proteína M, a identidade média intra-grupos para os grupos Tipo I, Tipo II sublinhagem 01 e Tipo II sublinhagem 02 foram todas de 100%, sendo que, em relação à amostra vacinal de CCoV submetida ao seqüenciamento de DNA, a maior identidade ocorreu com o grupo Tipo II sublinhagem 01, com um valor de 100%, seguido de 97,2% para o Tipo II sublinhagem 02 e 93,2% para o Tipo I.

Considerando-se as identidades intergrupos, para as duas sublinhagens do Tipo I a mesma foi de 98,6%, sendo que, em relação a estas duas sublinhagens e o grupo Tipo I, a identidade média de aminoácidos foi de 94,5 e 93,2%, respectivamente.

As identidades médias, mínimas e máximas intra e intergrupos encontram-se expostas na tabela 1.

Tabela 1 Identidades (em porcentagem) de aminoácidos mínimas, médias e máximas para os aminoácidos 156 a 229 (relativas à seqüência de número de acesso GenBank AY704916.1) da proteína de membrana M de amostras de *Coronavírus canino* (*CCoV*) detectadas no presente estudo (em negrito), juntamente com seqüências homólogas recuperadas do Genbank, de acordo com os respectivos grupamentos: Tipo I = *CCoV* Tipo I; TipoIIsub01 = *CCoV* Tipo II sublinhagem 01; TipoIIsub02 = *CCoV* Tipo II sublinhagem 02; Vac = Vacina contra *CCoV*; São Paulo, 2009

Grupo	**Mínima**	**Média**	**Máxima**
Tipo I	100	100	100
TipoIIsub01	94,5	100	99,3
TipoIIsub02 x TipoIIsub01	94,5	98,6	97,096
TipoIIsub02	100	100	100
TipoIIsub01 x TipoI	90,5	94,5	93,1
TipoIIsub02 x TipoI	93,2	93,2	93,2
TipoIIsub01 x Vac	100	100	100
TipoIIsub02 x Vac	97,2	97,2	97,2
TipoI x Vac	93,2	93,2	93,2

5 DISCUSSÃO

O coronavírus canino, tanto do tipo I quanto II, é um patógeno que vem merecendo crescente atenção em enterites de cães em um nível mundial em função de sua freqüência de ocorrência e diversidade genética e da existência de patótipos pantrópicos (EVERMANN et al., 2005; BUONAVOGLIA et al., 2006; DECARO et al., 2008).

Por sua vez, os rotavírus, ainda que não se constituam em patógenos de relevância para enterites em cães, podem ter nestes animais reservatórios e destes se transmitir para outros animais, inclusive o homem (VONSOVER et al.,1993).

Na presente investigação, encontraram-se 47 amostras fecais de cães positivas para Coronavírus canino em animais com e sem sinais de enterite de um total de 100 avaliadas, sendo que o seqüenciamento de DNA de 22 destas amostras revelou que 12 pertencem ao tipo II e 10 ao tipo I deste vírus, enquanto que nenhuma destas amostras se apresentou positiva para rotavírus.

Rotavírus já foram encontrados em amostras fecais de cães no Brasil (GABBAY et al., 2003; RUIZ et al., 2009), mas são escassos relatos neste tema, mais provavelmente em função da baixa freqüência de ocorrência e importância deste vírus nesta espécie animal.

Assim, a ausência de animais positivos para rotavírus dentre os 100 amostrados pode de fato ser uma indicação de que, para a população de cães estudada na região geográfica considerada, a freqüência deste vírus seja de fato baixa, o que é concordante com o relatado para rotavírus em cães utilizando-se a mesma técnica de PAGE (YESILBAG et al., 2007) e que, por sua vez, pode ser uma conseqüência da ausência de contato destes animais com animais de produção como suínos e bovinos, nos quais uma elevada freqüência de rotavírus é esperada (KAPIKIAN et al., 1994), o que tornaria mais provável a transmissão entre estas espécies e os cães, os quais já foram demonstrados como portadores de rotavírus mais comumente encontrados em outras espécies animais (PALOMBO, 2002).

Ainda, deve ser considerado que a PAGE, utilizada aqui para a pesquisa de rotavírus, apresenta uma baixa sensibilidade analítica quando comparada a técnicas como a PCR (XU et al., 1990; ESTES; KAPIKIAN, 2007), o que levaria a resultados falso-negativos para animais que estivessem excretando baixos títulos virais nas fezes.

Entretanto, quer os animais estudados não apresentassem de fato qualquer quantidade de rotavírus, quer fosse o caso de que alguns dos animais estudados estivessem excretando rotavírus em títulos baixos, pode-se especular que a probabilidade de transmissão para seres humanos e a relevância dos cães para a cadeia epidemiológica das rotaviroses na região estudada seria minimizada.

Para uma mais detalhada compreensão do papel dos cães como reservatórios de rotavírus, uma vez que, como exposto até este ponto, o diagnóstico direto resulta em baixa freqüência de positivos, estudos voltados à determinação da ocorrência de anticorpos anti-rotavírus em cães se constituem em um método de eleição para inquéritos epidemiológicos de triagem, visto permitirem inferir se os animais em estudo tiveram, em qualquer momento de sua vida, com este vírus.

Considerando-se o total de animais positivos para a presença de *CCoV*, nota-se uma elevada freqüência de ocorrência deste vírus na população estudada quando se compara com os relatos de investigações similares, tanto em machos quanto em fêmeas..

Por exemplo, em uma investigação realizada no Reino Unido (STAVISKY et al., 2009), utilizando-se como método de diagnóstico a mesma RT-PCR para o gene M utilizada no presente estudo, observou-se uma ocorrência tão baixa quanto 2,8% de um total de 249 cães amostrados, tendo sido positivos apenas os cães sem gastrenterite no momento de colheita das amostras, sendo todas as amostras classificadas como tipo I, sugerindo-se que estes animais estivessem já em fase de convalescência para a doença.

Já em cães com diarréia, a freqüência de ocorrência de coronavírus canino já foi relatada como variando de 15 a 42% (BANDAI et al., 1999; PRATELLI et al., 2000; YESILBAG et al., 2004), sendo a variação, possivelmente, devida à densidade populacional e ao estado imunitário dos animais.

A densidade populacional é, de fato, capaz de elevar a freqüência de ocorrência de *CCoV*, sobretudo em canis (SOKOLOW et al., 2005), o que pode ter impedido que a ocorrência no presente estudo fosse ainda maior, visto que o número de cães nos locais amostrados variou de 1 a 20 (Quadro 1).

Com exposto em Material e Métodos, uma vez que nenhum dos animais amostrados havia sido vacinados contra a coronavirose canina quando as amostras fecais foram colhidas e que a vacinação contra esta doença pode de fato diminuir a ocorrência de *CCoV* em cães (PRATELLI et al., 2003; PRATELLI, 2007), pode-se sugerir que a ausência de vacinação tenha sido uma das razões para tal freqüência de

detecção, tendo permitido que os animais estudado se tornassem mais susceptíveis à infecção.

À ausência de vacinação pode-se somar a precoce idade dos cães amostrados como fator predisponente à infecção e doença pelo *CCoV*, visto que cães jovens são mais susceptíveis a estes eventos (POLLOCK; CARMICHAEL, 1983).

Ainda, é necessário que se considere que os animais foram amostrados em uma ampla região geográfica, o que eleva a probabilidade de detecção de patógenos em função da diminuição de vícios amostras inerentes a esta ou aquela região.

Comparando-se a ocorrência de *CCoV* entre os animais com e sem diarréia no momento de colheita, nota-se que, naqueles com diarréia, a mesma foi significativamente superior (p=0,003), o que denota a participação deste vírus na etiologia de gastrenterite nos casos aqui estudados.

Deve-se destacar que esta assertiva deve ser tomada com cautela, pois, no presente estudo, outros patógenos do trato entérico de cães que poderiam, em associação com *CCoV* ou em infecções únicas, levar a sintomas similares, como calicivirus, astrovirus, adenovirus, criptosporidium e giárdias (PRATELLI et al., 1999b; YESILBAG et al., 2007) não foram pesquisados.

Quanto à detecção de *CCoV* nos 16 cães sem sinais de gastrenterite, é possível que os mesmos se encontrassem ainda em período de incubação para a coronavirose canina, visto que a mesma pode ser de até 72 horas (APPEL, 1987). Caso isto tenha sido que ocorreu, é possível que estes animais tenham desenvolvido diarréia no período que se seguiu à colheita, após o período de incubação.

De outro modo, pode-se sugerir que estes animais sadios já tivessem passado pelo período clínico da doença, entrando em convalescença mas inda excretando *CCoV*, mesmo que em baixos títulos, detectáveis pela PCR em função de sua elevada sensibilidade analítica (PRATELLI et al., 1999; PRATELLI et al., 2000).

Finalmente, a própria ausência dos outros patógenos já citados poderia ter evitado que a infecção por *CCoV* se manifestasse de forma mais severa nestes 16 animais, o que poderia ser facilitado por variáveis não analisadas neste estudo, como o estado nutricional dos animais e a condição higiênica nas quais os mesmos eram mantidos.

De todos os modos, o fato é que cães sem sintomas de diarréias mas com excreção de *CCoV* como os aqui detectados, a despeito dos fatores que levassem a estes achados, se constituem em uma importante fonte de infecção para outros cães, uma vez que passam clinicamente não diagnosticados, mantendo a cadeia epidemiológica da coronavirose

entérica canina, sobretudo quando se considera que o período de excreção do *CCoV* por um cão possa ser de até 156 dias, continuando mesmo após a cessação dos sintomas (PRATELLI et al., 2002).

Destas 47 amostras de *CCoV* detectadas, 22 resultaram em seqüências viáveis para o gene codificador da proteína de membrana M, sendo que, pela topologia obtida na árvore genealógica, 10 pertencem ao tipo I e 12 ao tipo II desta espécie viral.

Observando-se a distribuição das amostras tipo I e II sobre a população canina estudada expostos no quadro 1, pode-se notar inicialmente que os dois tipos virais estão amplamente distribuídos na região geográfica estudada.

De um modo mais aprofundado, ponderando-se sobre a topologia da árvore genealógica apresentada na figura 2 os diferentes pontos de colheita como casas, abrigos de animais e hospitais/ clínicas veterinárias, nota-se que não houve subgrupamentos próprios de um dado ponto, que para as amostras do tipo I, quer para as do tipo II, o que pode significar que as linhagens virais detectadas têm sua transmissão perpetuada na população canina e os possíveis contatos com a rua para alguns dos cães estudados (quadro 1) poderiam predispor tanto à aquisição de *CCoV* por um cão quanto para que um cão já infectado comum a linhagem se *CCoV* a dissemine por contágio indireto quando tenha acesso à rua.

Observando-se especificamente o grupamento referente às amostras do tipo II do *CCoV*, nota-se (figura 2) que três amostras detectadas no presente estudo resultaram em uma sublinhagem, denominadas de CCoV tipo II sublinhagen 02.

Pode-se sugerir que esta sublinhagem seja uma linhagem de *CCoV* tipo II que emergiu exclusivamente entre cães do Brasil, em função de elevada freqüência de CCoV, o que pode aumentar a probabilidade de ocorrência de divergências, e de possíveis falhas vacinais por diferenças entre a amostra vacinal tipo II e as amostras de campo tipo II, e, dessa forma, a vacina não diminuiria a transmissão e novas linhagens de CCoV II emergiriam.

Em uma investigação similar realizada na Suécia (ESCUTENAIRE et al., 2007), uma sublinhagem de *CCoV* tipo II foi também encontrada naquele país, analisando-se a mesma região do gene M aqui considerada, além do gene S, tendo-se sugerido que a recombinação possa ter tido um papel na geração de diferenças nas topologias das árvores para cada região gênica estudada.

Ainda para o tipo II de *CCoV*, uma sublinhagem foi também identificada na Austrália (NAYLOR et al., 2001), demonstrando que este tende a ser um evento comum para este tipo de CCoV.

É possível, também, que a maior diversidade molecular encontrada para o tipo II impeça que a vacina controle eficientemente todas as linhagens do tipo II, permitindo a emergência e a perpetuação de mutantes que escapam a neutralização.

Esta é uma hipótese plausível quando se leva em conta a comparação da amostra vacinal seqüenciada, tomada dentre aquelas atualmente em uso no Brasil, notando-se que as identidades para as sub linhagens 1 e 2 do tipo II foram, em média, de 100 e 97,2%, respectivamente, enquanto que, em relação ao tipo I, a mesma foi de 93,2%.

Além disso, a maior diversidade do *CCoV* tipo II fica evidente quando se nota que a identidade média de aminoácidos para as amostras classificadas como tipo II sublinhagem 1, ou seja, excetuando-se a sublinhagem 2 aqui detectada, foi de 99,3%, com mínimo de 94,5% (tabela 1), enquanto que para o tipo I, todos as 12 amostras de CCoV do presente estudo e as 3 seqüências recuperadas do Genbank resultaram em 100% de identidade.

As seqüências do gene M de *CCoV* geradas no presente trabalho são as únicas disponíveis até o presente momento para amostras brasileiras do vírus, considerando-se tanto este quanto qualquer outro gene, o que não permitiu que a genealogia aqui apresentada fosse somada de um número maior e mais diverso de seqüências, que poderiam apoiar ou contradizer os elementos discutidos obre a mesma.

Ainda que apenas uma pequena porção do gene da proteína de membrana do coronavírus canino tenha sido estudada na presente investigação, o padrão de segregação das seqüências recuperadas do GenBank é concordante com a classificação encontrada nos registros das mesmas quanto a tipos I e II deste vírus, o que vem a validar não apenas a região gênica estudada, mas também o método de reconstrução genealógica e o modelo evolutivo utilizados com a finalidade de se esclarecer a epidemiologia molecular da coronavirose entérica canina.

A proteína M do coronavírus canino, em sua porção amino-terminal, é altamente imunogênica (ESCUTENAIRE et al., 2007), mas, ainda que se possa sugerir que a distância em termos de aminoácidos para a proteína M possa em parte ser responsável por falhas vacinais, tais inferências podem ser mais seguramente realizadas em estudos baseados na proteína S, visto que a mesma é o principal alvo para anticorpos neutralizantes para os coronavírus (MASTERS et al., 2006).

Assim sendo, para estudos futuros de genealogia de *CCoV* em amostras brasileiras, é fundamental que se utilize o gene S, sobretudo a porção codificadora da subunidade S1, para que relações antigênicas com vacinas possam ser estabelecidas com maior segurança.

O isolamento em cultivo celular amostras de *CCoV* aqui detectadas, utilizando-se, por exemplo, células da linhagem A-72, originária de fibroma canino, poderia contribuir para um mais completo entendimento das características fenotípicas como capacidade de formação de sincícios, intensidade de efeitos citopáticos e períodos de incubação e mesmo estudos mais aprofundados acerca da patogenia intracelular, como vias de apoptose.

Além disso, uma vez isoladas amostras e cultivo celular, poder-se-iam tanto produzir soros hiperimunes para as diversas amostras se estudarem as características antigênicas das mesmas como, por exemplo, em testes de neutralização cruzada.

Finalmente, estudos futuros devem ser expandidos para outras regiões geográficas, tanto aqueles que visem coronavírus canino quanto rotavírus em cães, diversificando-se a amostragem para a inclusão de cães provenientes de faixas etárias mais avançadas, tanto com quanto sem gastrenterite, para um mais completo entendimento da cadeia epidemiológica da coronavirose entérica canina, bem como cães provenientes de zona rural, onde o contato com outros animais torna possível a transmissão inter-epécies de rotavírus.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos e das discussões expostas, pode-se concluir que:

- Cães jovens com enterite sintomática, bem como sadios, não tiveram papel como reservatório para rotavírus, considerando-se a região geográfica e o período de colheita de amostras.

- O CCoV ocorreu com uma freqüência de 47% na população canina estudada, com freqüência estatisticamente significativamente superior naqueles com diarréia do que naqueles sem diarréia.

- Amostras brasileiras de CCoV, com base em seqüenciamento parcial do gene codificador da proteína de membrana M, ocorrem tanto como tipo I quanto II, sendo que, para o tipo II, há uma linhagem tipicamente brasileira.

REFERÊNCIAS

APPEL, M. J. Canine coronavirus. In: APPEL, M. J. (Ed.). **Virus infections of carnivores**. Amsterdam: Elsevier Science, 1987. p. 115–122.

BANDAI, C.; ISHIGURO, S.; MASUYA, N.; HOHDATSU, T.; MOCHIZUKI, M. Canine coronavirus infections in Japan: virological and epidemiological aspects. **Journal of Veterinary Medicine and Science**. v. 61, p. 731-736, 1999.

BUONAVOGLIA, C.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; ELIA, E.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; CASTAGNARO; M.; TEMPESTA, M. Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 492-494, 2006.

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 attachment and cell-cell fusion. **Virology**, v. 119, n. 2, p. 358-371, 1982.

COOK, N.; BRIDGER, J.; KENDALL, K.; GOMARA, M. I.; EL-ATTAR, L.; GRAY, J. The zoonotic potential of rotavirus. **Journal of Infection**, v. 48, n. 4, p. 289-302, 2004.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; LORUSSO, A.; DESARIO, C.; MARI, V.; COLAIANNI, M. L.; ELLIA, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. **Veterinary Microbiology**, v. 128,n. 3-4, p. 253-260, 2008.

ENGLEBERG, N. C.; HOLBURT, E. N.; BARRETT, T. J.; GARY JR, G. W.; TRUJILLO, M. H.; FELDMAN, R. A.; HUGHES J. M. Epidemiology of diarrhoea due to rotavirus on an Indian reservation: risk factors in the home environment. **Journal of Infectious Diseases**, v. 145, p. 894-898, 1982.

ERLES, K.; TOOMEY, C.; BROOKS, H. W.; BROWNLIE, J. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. **Virology**, v. 310, n. 2, p. 216-223, 2003.

ESCUTENAIRE, S.; ISAKSSON, M.; RENSTRÖM, L. H.; KLINGEBORN, B.; BUONAVOGLIA, C.; BERG, M.; BELÁK, S.; THORÉN, P. Characterization of divergent and atypical canine coronaviruses from Sweden. **Archives of Virology**, v. 152, n. 8, p. 1507-1514, 2007.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincot Willians & Wilkins, 2007. p. 1918-1976.

EVERMANN, J. F.; ABBOTT, J. R.; HAN, S.; Canine coronavirus-associated puppy mortality without evidence of concurrent canine parvovirus infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, n. 6, p. 610-614, 2005.

GABBAY, Y. B.; HOMEM, V. S. F.; MUNFORD, V.; ALVES, A. S.; MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; RÁCZ, M. L. Detection of rotaviorus in dogs with diarrhea in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 77-80, 2003.

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

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, n. 2, p. 95-98, 1999.

HERRING, A. J.; INGLIS, N. F.; OJEH, C. K.; SNODGRASS, D. R.; MENZIES J. D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained poliacrylamide gels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.16, n. 3, p. 473-477, 1982.

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

KAPIKIAN, A. Z. Viral infections of the gastrointestinal tract. 2 ed. New York: Marcel-Dekker, 1994, 785 p.

LAIRD, A. R.; IBARRA, V.; RUIZ-PALACIOS, G.; GUERRERO, M. L.; GLASS, R. I.; GENTSCH, J. R. Unexpected detection of animal VP7 genes among common rotavirus strains isolated from children in Mexico. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4400-4403, 2003.

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

MOCHIZUKI, M.; MINAMI, K.; SAKAMOTO, H. Sero-epizootiological studies on rotavirus infection of dogs and cats. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 48, n. 5, p. 957-964, 1986.

MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; ISHIDA, T. Recent epidemiological status of canine viral enteric infections and Giardia infection in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 63, n. 5, p. 573-575, 2001

MOSCA, X. Detecção de coronavírus e parvovírus caninos em amostras fecais de cães por métodos moleculares. 2003. 162 f. Dissertação (Mestrado)-Instituto de Ciências Biomedicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NAKAGOMI, O.; MOCHIZUKI, M.; ABOUDY, Y.; SHIF I.; SILBERSTEIN, I.; NAKAGOMI, T. Hemagglutination by a human rotavirus isolate as evidence for transmission of animal rotaviruses to humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 1011-1013, 1992.

NAKAGOMI, T.; NAKAGOMI, O. Human rotavirus HCR3 possesses a genomic RNA constellation indistinguishable from that of feline and canine rotaviruses. **Archives of Virology**, v. 145, n. 11, p. 2403-2409, 2000.

NAYLOR, M. J.; HARRISON, G. A.; MONCKTON, R. P.; MCORIST, S.; LEHRBACH, P. R.; DEANE, E. M. Identification of canine coronavirus strains from feces by S gene nested PCR and molecular characterization of a new Australian isolate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 1036-1041, 2001.

PALOMBO, E. A. Genetic analysis of Group A rotaviruses: evidence for interspecies transmission of rotavirus genes. **Virus Genes**, v. 24, n. 1, p. 11-20, 2002.

POLLOCK, R. V. H.; CARMICHAEL, L. E. Canine viral enteritis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1990, p. 268-287.

POLLOCK, R. V. H.; CARMICHAEL, L. E. Canine viral enteritis. **Veterinary Clinics of North American Small Animals Practices**, v. 13, p. 551-566, 1983.

PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; GRECO, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. **Journal of Virological Methods**, v. 80, n. 1, p. 11-15, 1999a.

PRATELLI, A.; TEMPESTA, M.; ROPERTO, F. P.; SAGAZIO, P.; CARMICHAEL, L. E.; BUONAVOGLIA, C. Fatal coronavirus infection in puppies following canine parvovirus 2b infection. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 11, n. 6, p. 550-553, 1999b.

PRATELLI, A.; BUONAVOGLIA, D.; MARTELLA, V.; TEMPESTA, M.; LAVAZZA, A.; BUONAVOGLIA, C. Diagnosis of canine coronavirus infection using nested-PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 84, n. 1, p. 91-94, 2000.

PRATELLI, A.; ELIA, G.; MARTELLA, V.; TINELLI, A.; DECARO, N.; MARSILIO, F.; BUONAVOGLIA, D.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. M gene evolution of canine coronavirus in naturally infected dogs. **Veterinary Record**, v. 151, n. 25, p. 758-761, 2002.

PRATELLI, A.; TINELLI, A.; DECARO, N.; CIRONE, F.; ELIA, G.; ROPERTO, S.; TEMPESTA, M.; BUONAVOGLIA, C. Efficacy of an inactivated canine coronavirus vaccine in pups. **New Microbiol**, v. 26, n. 2, p. 151-155, 2003.

PRATELLI, A.; DECARO, N.; TINELLI, A.; MARTELLA, V.; ELIA, G.; TEMPESTA, M.; CIRONE, F.; BUONAVOGLIA, C. Two genotypes of canine coronavirus simutaneously detected in the fecal samples of dogs with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 17978-1799, 2004.

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

PRATELLI A. High-cell-passage canine coronavirus vaccine providing sterilising immunity. **Journal of Small Animal Practices**, v. 48, n. 10, p. 574-578, 2007.

RUIZ, V. L. A.; BRANDÃO, P. E. ; GREGORI, F.; RODRIGUEZ, C. A. R.; SOUZA, S. L. P.; JEREZ, J. A. Isolation of rotavirus from asymptomatic dogs in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 61, n. 4, p. 996-999, 2009.

SOKOLOW, S. H.; RAND, C.; MARKS, S. L.; DRAZENOVICH, N. L.; KATHER, E. J.; FOLEY, J. E. Epidemiologic evaluation of diarrhea in dogs in an animal shelter. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 1018–1024, 2005.

STAVISKY, J.; PINCHBECK G. L,; GERMAN, A. J.; DAWSON, S.; GASKELL, R. M.; RYVAR, R.; RADFORD, A. D. Prevalence of canine enteric coronavirus in a

cross-sectional survey of dogs presenting at veterinary practices. **Veterinary Microbiology**, 2009, In press.

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.

TZIPORI, S.; MAKIN, T. Propagation of human rotavirus in young dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 55-63, 1978.

VONSOVER, A.; SHIF, I.; SILBERSTEIN, I.; RUDICH, H.; ABOUDY, Y.; MENDELSON, E.; SHULMAN, L.; NAKAGOMI, T. Identification of feline- and canine-like rotaviruses isolated from humans by restriction fragment length polymorphism assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 7, p. 1783-1787, 1993.

XU, L.; HARBOUR, D.; MCCRAE, M. A. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. **Journal of Virological Methods**, v. 27, n. 1, p. 29-37, 1990.

YESILBAG, K.; YILMAZ, Z.; OZKUL, A.; PRATELLI, A. Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea. **Veterinary Record**, v. 161, n. 5, p. 169-170, 2007

YESILBAG, K.; YILMAZ, Z.; TORUN, S.; PRATELLI, A. Canine coronavirus infection in Turkish dog population. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 51, n. 7, p. 353-355, 2004.