

**PAULO EDUARDO BRANDÃO**

**Coronavírus bovino (BCoV): ocorrência, diversidade molecular e padronização de PCR para diagnóstico a partir de amostras fecais de bezerros com e sem diarreia criados em municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil**

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

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. José Antonio Jerez

São Paulo

2004

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1346 FMVZ.	<p>Brandão, Paulo Eduardo</p> <p>Coronavirus bovino (BCoV): ocorrência, diversidade molecular e padronização de PCR para diagnóstico a partir de amostras fecais de bezerros com e sem diarreia criados em municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil / Paulo Eduardo Brandão. – São Paulo : P. E. Brandão, 2004</p> <p>92 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2004.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez.</p> <p>1. Coronavirus. 2. PCR. 3. Diarreia. 4. Bovinos. 5. Genealogia. 6. Genótipos. I. Título.</p>
-----------------	---



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


*Comissão Bioética*

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção de coronavírus bovino pelas provas de hemaglutinação/inibição da hemaglutinação e TR-PCR e comparação molecular dos coronavírus a partir de amostras fecais de bezerros com diarreia criados em diversas propriedades localizadas no Estado de São Paulo", Protocolo nº 46/2002, sob a responsabilidade do Prof.Dr. José Antonio Jerez, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 27/02/2002.

(We certify that the Research "Bovine coronavirus detection by haemmagglutination/haemmagglutination inhibition test and RT-PCR and coronaviruses molecular comparison in stool of diarrheic calves from São Paulo State" protocol number 46/2002, under the responsibility of Prof.Dr. José Antonio Jerez, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in 02/27/2002 meeting.)

São Paulo, 27 de fevereiro de 2002

  
Prof.ª Dr.ª Julia Maria Matera  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRANDÃO, P. E.

Título: Coronavírus bovino (BCoV): ocorrência, diversidade molecular e padronização de PCR para diagnóstico a partir de amostras fecais de bezerros com e sem diarreia criados em municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil

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

Data: 13/02/2004

### Banca Examinadora

Prof. Dr. MARCOS BRYAN HEINEMANN Instituição: FAV - UNB  
Assinatura: Marcos B. Heinemann Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. SUDA MIYOSHI SAKAMOTO Instituição: Rede TB - MCT  
Assinatura: Udair Miguel Sakamoto Julgamento: Aprovado

Prof. Dr. Rodrigo Martins Soares Instituição: FMVZ - USP  
Assinatura: RM Soares Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. LEONARDO ERICHTENHAIN Instituição: FMVZ/USP  
Assinatura: Leandro Erich Julgamento: APROVADO

Prof. Dr. Antônio Luiz Instituição: USP - FMVZ  
Assinatura: Antônio Luiz Julgamento: Aprovado

Para Laura,  
que surgiu em minha vida trazendo amor e felicidade  
e quem eu vi se tornar verdadeira pesquisadora,

dedico.

*Ora, lege, lege, lege, relege, labora et invenies*

## **AGRADECIMENTOS**

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

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, pelas sugestões durante o andamento desta pesquisa e pela cessão de seu conhecimento ímpar.

Profs. Drs. Rodrigo Martins Soares e Marcos Bryan Heinemann por seu envolvimento na realização prática e pelas discussões teóricas sobre filogenia molecular e evolução

Prof. Dra. Maria da Glória Buzinaro, pela colaboração com sugestões e envio de amostras

Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira e Dra. Claudete Serrano Alstolfi Ferreira, amigos e colaboradores, pelo incentivo durante todos os anos de pós-graduação

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, Dr. Sidnei M. Sakamoto e Prof. Dr. Fernando Ferreira pelas conversas sérias e pelas descontraídas e pelas sugestões

Alexandre Abelardo Sanches, amigo, colaborador em todos os momentos, cuja eficiência foi fundamental à conclusão deste trabalho

Dr. Fabio Gregori e Cesar Alejandro Rosales Rodriguez, pela colaboração direta a cada passo e pelo companheirismo constante ao longo de muitos, muitos anos

Dr. Carlos Henrique de Azeredo Lima e Vera Letticie Ruiz, amigos e colaboradores de todas as horas

Silvio L. Pereira de Souza, pesquisador, cientista, colaborador, exemplo

Gianca Silva Monteleone, Sabrina Sonza e Paulo H. B. de Freitas, coronavirologistas emergentes, sobre os quais muito se ouvirá

Adriana Cortez, por todos os auxílios prestados no LABMAS - VPS

Aos todos os pós-graduandos do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP e aos que são de outros departamentos e que por aqui circulam, dos quais depende a pesquisa na Universidade

Aos funcionários do VPS

Aos que são e aos que já foram membros das famílias Brandão, Nascimento e Niero

Prof. Dr. Sílvio de Arruda Vasconcellos pela pós-graduação no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP

À FAPESP

## RESUMO

BRANDÃO, P. E. **Coronavírus bovino (BCoV)**: ocorrência, diversidade molecular e padronização de PCR para diagnóstico a partir de amostras fecais de bezerros com e sem diarreia criados em municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil. [Bovine coronavirus (BCoV): occurrence, molecular diversity and standardization of a PCR to diagnosis using stool samples of calves with and without diarrhea from municipalities of São Paulo and Minas Gerais States, Brazil]. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O coronavírus bovino (BCoV) é classificado no grupo 2 do gênero *Coronavirus* da ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, causando diarreia em bezerros neonatos, processos respiratórios em bezerros não neonatos e disenteria em vacas adultas. No presente estudo, 203 amostras fecais de bezerros de 19 propriedades leiteiras nos Estados de São Paulo e Minas Gerais foram submetidas à prova de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação (HA/HI) para a detecção de coronavírus e a uma reação de PCR dirigida ao gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente dos coronavírus (PCR *pol*), sendo feita a comparação entre as duas técnicas através dos testes Kappa e J de Youden. Amostras positivas à PCR *pol* foram submetidas a uma reação de PCR para amplificação de um segmento de 488 pares de bases correspondentes à região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S, sendo os fragmentos submetidos a seqüenciamento de DNA para a reconstrução genealógica das amostras estudadas. Ainda, a presença de rotavírus foi pesquisada pela técnica de PAGE. Segundo a técnica de HA/ HI, 35,47% das amostras e 73,68% das propriedades rurais foram positivas para BCoV, enquanto que pela PCR *pol* 25,12% das amostras e 52,63% das propriedades rurais foram positivas para este vírus. A comparação entre as duas técnicas resultou valores de kappa de -0,048 para os resultados individuais e -0,08 em relação às propriedades rurais e J de Youden de -0,045 para os resultados individuais e -0,1 em relação às propriedades rurais, demonstrando baixa concordância entre as duas provas. A genealogia

obtida por máxima parcimônia através de algoritmo heurístico e baseada em seqüências da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S de 15 amostras de campo aqui estudadas, da amostra Kakegawa de coronavírus bovino utilizada como controle positivo e de 10 seqüências recuperadas dos GenBank revelou a existência de dois genotipos dentro desta espécie viral, sendo os dois genotipos encontrados entre amostras brasileiras. A identidade média de nucleotídeos entre as 15 amostras brasileiras foi de 98,34%, com similaridade média de aminoácidos de 98%. Amostras pertencentes ao genotipo 2 apresentaram uma deleção de 18 nucleotídeos/ 6 aminoácidos dentro da região correspondente ao domínio II da proteína S. A árvore de máxima parcimônia enraizada tendo bredavírus como grupo externo revelou que esta deleção ocorreu em um único momento na genealogia dos coronavírus bovinos. Rotavírus foi encontrado em 12,6% das amostras fecais individuais e 28, 57% das propriedades rurais pesquisadas. Estes resultados são os primeiros baseados em amostras brasileiras de coronavírus bovino e contribuem para a caracterização molecular do BCoV, para a predição da eficiência de imunógenos e para o encontro de marcadores moleculares úteis para estudos epidemiológicos continuados em relação às diarreias neonatais em bovinos.

Palavras-chave: Coronavírus. PCR. Diarreia. Bovinos. Genealogia. Genotipos.



## ABSTRACT

BRANDÃO, P. E. **Bovine coronavirus (BCoV):** occurrence, molecular diversity and standardization of a PCR to diagnosis using stool samples of calves with and without diarrhea from municipalities of São Paulo and Minas Gerais States, Brazil. [Coronavírus bovino (BCoV): ocorrência, diversidade molecular e padronização de PCR para diagnóstico a partir de amostras fecais de bezerros com e sem diarreia criados em municípios dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, Brasil]. 2004. 92 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Bovine coronavirus (BCoV) belongs to group 2 of the genus *Coronavirus* from the order *Nidovirales*, family *Coronaviridae* and causes diarrhea in newborn calves, respiratory diseases in non-newborn calves and dysentery in cows. In the present study, 203 stool samples of calves from 19 dairy farms from São Paulo and Minas Gerais States were submitted to hemagglutination/ hemagglutination inhibition test (HA/HI) to bovine coronavirus detection and a PCR assay targeted to the RNA-polymerase RNA-dependent gene of coronaviruses (PCR *pol*), the comparison between the two tests carried out with Kappa and Youden's J tests. Samples positive to PCR *pol* were submitted to a PCR assay that amplifies a 488 base-pair fragment which corresponds to the hypervariable region of the gene coding for the S1 subunit of the S protein; the amplified fragments were submitted to DNA sequencing aiming the genealogic reconstruction of the studied samples. Rotavirus was surveyed with the PAGE test. The HA/ HI test resulted 35.47% of samples and 73.68% of farms positive to BCoV, while, according to PCR *pol*, 25.12% of the samples and 52.63% of the farms were positive to this virus. The comparison between the two tests produced a kappa value of -0.048 to individual results and -0.08 to the farms and Youden's J value of -0.045 to individual results and -0.1 to the farms, showing low agreement between the two tests. Maximum parsimony genealogy with an heuristic algorithm based on sequences of the hypervariable region of the gene coding for the S1 subunit of the S protein from 15 field samples here studied, from the Kakegawa bovine coronavirus strain used as positive control and from 10

sequences retrieved from GenBank showed the existence of two genotypes in this viral species. Mean nucleotide identity between the 15 Brazilian samples was 98.34%, with mean amino acid similarity of 98%. Samples from genotype 2 showed a deletion of 18 nucleotides/ 6 amino acids inside the domain II region of the S protein. Rooted maximum parsimony tree with bredavirus as an outgroup revealed that this deletion has happened only once in bovine coronavirus genealogy. Rotavirus was found in 12.6 % of stool samples and 28.57% of the surveyed farms. These are the first results based on Brazilian strains of bovine coronavirus and contribute to molecular characterization of BCoV, to the prediction of the efficiency of immunogens and to the finding of molecular markers useful to continued epidemiologic surveys on newborn bovine diarrhea.

Key words: Coronavirus. PCR. Diarrhea. Bovines. Genealogy. Genotypes.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

'= minuto de hora

%= por cento

μg= micrograma

μl= microlitro

aa = aminoácido

BLASTn=Basic Local Alignment Search Tool

BSA= soroalbumina bovina

°C= graus Celsius

cDNA= DNA complementar

dNTP= deoxinucleosídeo-trifosfato

DNA= ácido desoxirribonucléico

et al.= e colaboradores

ELISA= enzyme-linked immunosorbent assay

EUA = Estados Unidos da América

g= aceleração da gravidade terrestre (9,8 m/s<sup>2</sup>)

kB = quilobases

kDa = quiloDalton

M= molar

mM= milimolar

ng= nanogramas

nm= nanômetro

ORF= open reading frame

pb= pares de bases

PBS = solução tampão fosfato

PCR = reação em cadeia pela polimerase

pH= concentração de hidrogênio iônico

pmol= picomoles

RNA= ácido ribonucléico

RT= transcrição reversa

TRIS= hidroximetil-aminometano

U= unidades

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1	AMOSTRAS FECAIS.....	27
3.2	AMOSTRA PADRÃO DE CORONAVÍRUS BOVINO.....	27
3.3	PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO/ INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA/HI) PARA DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS BOVINO.....	28
3.3.1	Produção de soro hiperimune anti-coronavírus bovino.....	28
3.3.2	Prova de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação (HA/HI).....	29
3.4	PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE PCR PARA DETECÇÃO DO GENE CODIFICADOR DA RNA-POLIMERASE-RNA DEPENDENTE DOS CORONAVÍRUS (PCR <i>POL</i> ).....	30
3.5	COMPARAÇÃO ENTRE PCR PARA O GENE <i>POL</i> E HA/HI PARA A DETECÇÃO DE BCoV.....	33
3.6	PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE PCR PARA DETECÇÃO DO GENE CODIFICADOR DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV (PCR S1).....	34
3.7	PESQUISA DE ROTAVÍRUS NAS AMOSTRAS FECAIS PELA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).....	37
3.8	SEQÜENCIAMENTO DE DNA.....	38
3.9	ANÁLISE GENEALÓGICA.....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	41
4.1	APLICAÇÃO DA PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO/ INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA/HI) PARA DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS BOVINO.....	41
4.2	PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR DIRIGIDA AO GENE <i>POL</i> PARA A DETECÇÃO DE BCoV NAS AMOSTRAS FECAIS.....	41
4.3	PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE PCR PARA A REGIÃO HIPERVARIÁVEL DO GENE CODIFICADOR DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV.....	43
4.4	SEQÜENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE GENEALÓGICA.....	44
4.5	COMPARAÇÃO ENTRE PCR PARA O GENE <i>POL</i> E HA/HI PARA A DETECÇÃO DE BCoV.....	56
4.6	PESQUISA DE ROTAVÍRUS NAS AMOSTRAS FECAIS PELA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE).....	57
4.7	CO-INFECÇÕES POR BCoV E ROTAVÍRUS.....	57
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	74
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	75
	<b>ANEXOS</b> .....	88

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com o Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV), 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; VAN REGENMORTEL et al., 2000). O gênero *Coronavirus* é ainda subdividido em três grupos definidos por epítomos presentes nas glicoproteínas de envelope, seqüências de nucleotídeos e hospedeiros naturais (Quadro 1) (HOLMES; LAI, 1996).

Os coronavírus são vírus envelopados pleomórficos aproximadamente arredondados com cerca de 100-150 nm de diâmetro, com cinco ou seis proteínas estruturais (N, M, sM, HE, S e I), dependendo da espécie viral. O genoma é constituído por um RNA de fita simples não-segmentado de sentido positivo com até 32 kb, originando um nucleocapsídeo de simetria helicoidal em associação com a nucleoproteína N, uma fosfoproteína de 50-60kDa rica em aminoácidos básicos (HOLMES; LAI, 1996; LAI; CAVANAGH, 1997).

O envelope viral é formado por uma camada dupla de lipídios com quatro ou cinco proteínas estruturais (M, sM, HE, S e I) dela se projetando, resultando no aspecto de uma coroa (do latim *corona*). Há alguns anos, um *core* esférico foi encontrado em crioelctromicroscopia no vírus da gastroenterite transmissível dos suínos, *core* este constituído pela proteína N associada à proteína M ou uma subclasse desta (RISCO et al., 1996).

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

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

Quadro 1 - Coronavírus, hospedeiros naturais e doenças por eles causadas (Fonte: HOLMES; LAI, 1996; BRANDÃO et al., 2001) - São Paulo - 2003

A primeira doença a ser ligada a um coronavírus foi a bronquite infecciosa das galinhas, causada pelo IBV. Em 1931, Schalk (SCHALK; HAWN; DAK, 1931) observou uma doença respiratória aguda e fatal em galinhas jovens no Estado da Dakota do Norte, EUA, primeiramente tida como sendo pulorose, laringotraqueíte ou intoxicação por gases, mas galinhas inoculadas com filtrados de exsudatos e extratos de animais doentes desenvolveram os sintomas da bronquite, sendo o vírus definitivamente isolado em ovos embrionados em 1937 (BEAUDETTE; HUDSON, 1937).

A história dos coronavírus teve um período de silêncio até que em 1946 foi relatada uma doença de suínos com características de gastroenterite e de alta mortalidade entre leitões, reproduzida experimentalmente pela administração de filtrados de órgãos de suínos acometidos pela enfermidade a leitões neonatos, primeiros passos no esclarecimento da doença que viria a ser conhecida como gastroenterite transmissível dos suínos (DOYLE; HUTCHINGS, 1946).

Em um artigo relatando os resultados de uma avaliação a campo de uma vacina contra os rotavírus, Mebus, um dos mais produtivos pesquisadores dos primórdios das diarreias virais em bezerros, observou o que ele chamou de partículas “coronavirus-like” nas fezes de um bezerro experimentalmente inoculado com material colhido de um rebanho onde ocorria diarreia (MEBUS et al., 1972). Até que, no ano seguinte, o mesmo pesquisador relatou o isolamento deste coronavírus em células (MEBUS et al., 1973).

Em 2003, houve um grande aumento no interesse pelo coronavírus pela implicação do mesmo na etiologia de um processo respiratório agudo surgido em seres humanos sob a forma de surto do ano de 2002 no sudeste asiático, denominada de síndrome respiratória aguda grave, atualmente conhecida pela sigla em inglês SARS, coronavírus este com características genéticas tais que não permitiram que o mesmo fosse classificado em nenhum dos 3 atuais grupos de coronavírus conhecidos. (KSIAZEK et al., 2003; REST; MINDELL, 2003).

Em bovinos, a doença mais comumente causada por coronavírus é a diarreia neonatal, que afeta bezerros entre 3 a 4 semanas de idade, frequentemente em associação com rotavírus, *Cryptosporidium parvum*, *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Salmonella* sp (SNODGRASS et al., 1986). Entretanto, aos rotavírus e aos coronavírus pode ser atribuída maior importância, visto estarem estes presentes em aproximadamente 60 % dos casos de diarreias de bezerros neonatos (JEREZ, 1997). Estima-se que, nos EUA, as diarreias neonatais em bovinos levem a

prejuízos de US\$ 95 milhões a cada ano, US\$ 16,7 a US\$ 28,4 milhões inerentes ao coronavírus bovino (HOUSE, 1978).

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

Vacas adultas apresentam uma doença entérica denominada de disenteria de inverno, primeiramente descrita nos EUA, também causada pelo coronavírus bovino similar ao encontrado na diarreia neonatal (BENFIELD; SAIF, 1990; BRANDÃO et al., 2002; DEA; MICHAUD; MILANE, 1995). Ainda, o coronavírus bovino já foi também isolado de amostras fecais de ruminantes silvestres de vida livre e de cativeiro, o que vem a caracterizar estes como possíveis reservatórios para a coronavirose bovina (TSUNEMITSU et al., 1995).

O entendimento da patogenia, virulência e variabilidade entre os coronavírus bovinos passa, necessariamente, pela dissecação de suas proteínas estruturais e dos genes que as codificam, sobretudo as proteínas de envelope. Todas as proteínas de envelope são proteínas de classe I, ou seja, têm um domínio citoplasmático, um domínio transmembrana e um domínio extracelular (LAI ; CAVANAGH, 1997).

A proteína de matriz ou membrana (M), antigamente nomeada de E1, tem 225-230 aminoácidos de tamanho. Três domínios transmembrana são encontrados em M, enquanto que a porção carbóxi-terminal é o endodomínio da proteína. A proteína M desempenha função na



montagem da partícula viral, formando a estrutura do envelope e o *core*, sendo uma proteína de baixa variabilidade entre os coronavírus, na qual a ocorrência de mutações não leva a alterações na patogenicidade e no tropismo por tecidos, ao contrário do que ocorre com a proteína S (CLARK, 1993; LAI; CAVANAGH, 1997; VABRET et al. 2001; YAMADA et al., 2000).

Em conjunto com a proteína M, a proteína pequena de membrana (“Small membrane protein“, proteína sM ou E), composta de 84 a 109 aminoácidos, também é essencial à estrutura do envelope, mas seu polimorfismo é menos intenso do que, por exemplo, aquele relativo à proteína S (SIDDELL, 1995).

Como característica exclusiva de grupo, os coronavírus do grupo 2 apresentam uma proteína de envelope denominada de hemaglutinina-esterase (HE), com cerca de 65 kDa, encontrada sob a forma de dímeros (KING; POTTS; BRIAN, 1985). Apesar de sua denominação, a HE tem uma atividade hemaglutinante fraca quando comparada à da proteína S (SCHULTZE et al., 1991) e contém uma enzima destruidora de receptores (esterase) que cliva resíduos 9-O-acetil de ácidos siálicos (CLARK, 1993). Interessantemente, a proteína HE dos coronavírus guarda similaridade com a HE dos vírus influenza C, o que indica uma possível recombinação entre estes dois vírus (LUYTJES et al., 1988), apesar de alguns coronavírus do grupo 2 apresentarem uma especificidade por substratos diferentes quando comparados aos influenza C e ao BCoV (KLAUSEGGER et al., 1999).

Uma outra proteína estrutural dos coronavírus, encontrada no MHV e no BCoV, é denominada de proteína interna (I), a qual tem um papel, ainda que não essencial, na replicação viral, sem envolvimento no tropismo e na infectividade dos coronavírus (FISCHER et al., 1997; SENANAYAKE; BRIAN, 1997), mas a disponibilidade de seqüências do gene I, interno ao gene N, ainda é muito escassa para permitir estudos de variabilidade baseados no mesmo.

A principal proteína estrutural de envelope dos coronavírus é a proteína S (“spike”), antigamente nomeada de E2. Esta forma projeções de cerca de 20nm de comprimento responsáveis pela aparência espiculada do vírion e pela atividade hemaglutinante e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes (COLLINS et al., 1982). É também a proteína mais polimórfica entre os coronavírus, organizada como dímeros ou trímeros. A proteína completa tem 180 kDa, mas , em algumas espécies virais, como o BCoV, é clivável nas subunidades S1 e S2, com cerca de 90 kDa cada (CAVANAGH, 1995).

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

A subunidade S1, ectodomínio aminoterminal da proteína S, muito mais variável do que a subunidade S2, apresenta atividade de ligação a receptores celulares e forma o bulbo da espícula dos coronavírus (LAI; CAVANAGH, 1997). No MHV, o sítio de ligação ao receptor localiza-se no domínio amino-terminal de S1, composto de 330 aminoácidos (KUBO; YAMADA; TAGUCHI, 1994), sendo os aminoácidos 33 a 40 os diretamente envolvidos na atividade de ligação a receptores (SAEKI; OHTSUKA; TAGUCHI, 1997). Por formar a porção bulbar da proteína S que contém a maior parte dos sítios antigênicos, a subunidade S1

e o segmento do genoma dos coronavírus que a codifica são mais expostos a pressões seletivas imunológicas e, assim, mais propensos ao encontro de polimorfismos do que os demais genes e proteínas dos coronavírus (ABRAHAM et al., 1990).

A proteína S e o gene que a codifica têm se mostrado como os mais úteis para estudos acerca da variabilidade genética e antigênica e características de virulência entre diferentes amostras de coronavírus bovino e de outras espécies, bem como para a busca de marcadores moleculares que caracterizem uma determinada amostra de BCoV. A análise da variabilidade encontrada em S é considerada como a abordagem mais racional para se detectarem diferenças entre amostras de uma mesma espécie de coronavírus (COMPTON; VIVAS-GONZALEZ; MACY, 1999). Com base em mapeamento antigênico com anticorpos monoclonais, sabe-se, por exemplo, que uma troca de aminoácidos pontual no domínio antigênico II da proteína S pode gerar BCoV mutantes que escapam à soroneutralização (DONGWAN; DEREGT, 2001).

Uma demonstração bastante ilustrativa da importância do gene S para a busca por diferenças entre coronavírus é o fato de que o PRCoV, um vírus respiratório suíno que emergiu na Europa no início dos anos 80, tem uma larga deleção no gene S1 quando comparado com o TGEV, levando à perda de 2 sítios antigênicos e do enterotropismo (LAUDE; VAN REETH; PENSAERT, 1993; SÁNCHEZ et al., 1990; VAUGHN; HALBUR; PAUL, 1995). No TGEV, mutações nos aminoácidos localizados nas posições 145 a 155 de S1 afetam tanto a enteropatogenicidade quanto a atividade hemaglutinante (KREMPL et al., 1997).

O seqüenciamento do gene S já se mostrou útil, também, para a diferenciação de amostras de coronavírus entéricos provenientes de diferentes indivíduos e para a atribuição de propriedades biológicas divergentes conferidas pela proteína S, como a infectividade a culturas celulares (KUNITA; ZHANG; HOMBERGER, 1995; WESLEY, 1999), sendo,

portanto, de evidente aplicação para a detecção de novas variantes de coronavírus (NAYLOR et al., 2001). A diferenciação entre coronavírus com base na região hipervariável da proteína S é relatada como um meio eficiente para a diferenciação intra e inter-específica entre amostras de coronavírus (DONGWAN et al., 2000).

Somando-se a tal variabilidade o fato de que a proteína S induz anticorpos neutralizantes e que é a que tem recebido maior atenção como antígeno para imunógenos contra os coronavírus, fica claro que estudar a proteína S ou o gene que a codifica, integralmente ou elegendo áreas de maior variabilidade, como as regiões hipervariáveis da subunidade S1, apresenta-se como a alternativa mais produtiva para a previsão da adequabilidade de uma vacina (SAIF, 1993).

A mais importante e largamente estudada proteína não-estrutural dos coronavírus é a RNA polimerase RNA-dependente, produto do gene *pol*, que contem duas ORF. Esta proteína, uma poliproteína de 740-800kDa co-traducionalmente processada, é responsável pela transcrição e pela replicação virais, sendo altamente conservada entre os coronavírus, mesmo em se tratando de espécies de grupos diferentes (STEPHENSEN; CASEBOLT; GANGOPADHYAY, 1999).

Um método simples para o diagnóstico direto de coronavírus bovino, uma vez disponíveis soros hiperimunes, é a hemaglutinação seguida da confirmação pela inibição da hemaglutinação, que se utiliza da propriedade das proteínas S e HE de se ligarem a resíduos de ácidos siálicos, como, por exemplo, o ácido 9-O-acetil-neuramínico, presentes na superfície da membrana de hemácias (LAI; CAVANAGH, 1997; SATO et al., 1977). Este método já foi usado, além do diagnóstico, para estudos de variabilidade entre amostras de regiões geográficas diversas (KAPIL et al., 1999) onde diferenças antigênicas foram observadas entre os isolados e em pesquisas onde se evidenciou a aplicabilidade do mesmo

para a distinção sorológica entre coronavírus humanos e bovinos (EL-GHORR et al., 1989; GERNA et al., 1981).

A propriedade hemaglutinante dos coronavírus bovinos tem também aplicações para a pesquisa de anticorpos em testes de monitoração de soroconversão em epizootias e condições experimentais, tendo sido demonstrados aumentos substanciais nos títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação durante as fases iniciais da infecção (XIAOQING et al., 2001) e já se prestou até mesmo para o estabelecimento do BCoV como agente causal de processos respiratórios em bovinos (STORZ et al., 2000).

Métodos de ELISA com anticorpos policlonais e, mais atualmente, monoclonais, bem como imunohistoquímica, podem, também, ser utilizados para o diagnóstico direto dos coronavírus bovinos (CLARK, 1993; ZHANG et al., 1997).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) para o diagnóstico viral é de alta sensibilidade e especificidade (FORGHANI; ERDMAN, 1994), sendo o método de diagnóstico para coronavírus predominantemente observado na literatura pertinente. A capacidade deste método em detectar coronavírus pode ser notada em relatos de PCR para a detecção de coronavírus bovino com primers dirigidos ao gene codificador da proteína M com um limiar de detecção tão baixo quanto 5 a 10 moléculas de RNA (VERBEEK; TIJSSEN, 1990).

Uma variação da PCR também dirigida ao gene codificador da proteína M aplicável ao diagnóstico clínico de coronavírus canino em amostras fecais (PRATELLI et al., 1999) tornou-se uma alternativa interessante para o diagnóstico diferencial de gastroenterites em cães, demonstrada como sendo de sensibilidade relativa superior quando comparada à microscopia eletrônica, imunoeletromicroscopia e isolamento em cultivo celular (PRATELLI et al., 2000). A técnica de PCR tornou possível o diagnóstico acurado dos coronavírus felinos e a diferenciação entre amostras entéricas e aquelas causadoras da peritonite infecciosa dos

felinos com base no gene codificador da proteína S (GAMBLE et al., 1997; GUNN-MOORE; GRUFFYDD-JONES; HARBOUR., 1998).

Em suínos, por exemplo, a PCR facilitou o diagnóstico diferencial entre os coronavírus mais comumente encontrados nos mesmos, o vírus da gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV) e o coronavírus respiratório suíno (PRCoV), através de uma única reação com primers que geram produtos de tamanhos diferentes para cada um dos dois vírus com base em uma deleção presente no gene codificador da proteína S do PRCoV (PATON et al., 1997).

A análise por seqüenciamento da proteínas S é o enfoque mais eficiente para se compararem amostras de coronavírus, visto que é nesta proteína que se esperam encontrar maiores polimorfismos que permitam estabelecer relações genealógicas entre tais amostras (DONGWAN et al., 2000); no entanto, se a detecção por PCR de BCoV for tentada primeiramente com primers específicos para o gene codificador da proteína S, estes mesmos polimorfismos podem ser responsáveis por diagnósticos falso-negativos, visto que os primers podem acabar não se hibridizando com o RNA de BCoV. Assim, para aprimorar a eficiência no diagnóstico de BCoV nas amostras fecais, o enfoque necessário é buscar uma região no genoma dos coronavírus que seja altamente conservada, com alta identidade para todas as possíveis amostras.

Para tanto, uma abordagem que se mostra interessante para a utilização da PCR como diagnóstico direto é obter primers para a amplificação de segmentos do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente, visto que regiões de alta identidade podem ser encontradas entre diversas espécies de coronavírus (CASEBOLT; BIAO; STEPHENSEN, 1997; STEPHENSEN et al., 1999).

A disponibilidade de métodos de diagnóstico seguros e sua aplicação para a mensuração de frequências e para estudos da cadeia epidemiológica das coronaviroses

bovinas são, por si só, um grande passo, mas não são suficientes para a complexa tarefa de entender a variabilidade e a relação entre diferentes amostras.

O entendimento das relações genéticas entre diferentes amostras de um vírus e da evolução das mesmas é desejável no sentido de prover informações acerca da origem e distribuição geográfica de determinadas amostras, suas vias de transmissão e estudos vacinais. Para tanto, o método de reconstrução genealógica mais largamente utilizado em virologia é a máxima parcimônia, na qual se assume que cada sítio ou posição de nucleotídeo é um caractere, sendo o critério de otimização o comprimento total da árvore, ou seja, a árvore de menor somatória de comprimentos de ramos, menor número de passos ou grau de ramificação é a verdadeira. A máxima parcimônia tem por princípio a redução do conjunto de dados pela eliminação de todos os caracteres não variáveis entre diferentes seqüências e dos caracteres que variam apenas em uma das seqüências, considerando-se como sítios de parcimônia informativos aqueles nos quais dois ou mais resíduos estão representados cada um mais de uma vez no conjunto de dados, assumindo-se, portanto, um modelo evolutivo implícito no qual uma substituição é mais provável do que duas, sendo selecionada a árvore com topologia que minimiza o número de substituições nestes sítios, ou seja, a árvore que requer o menor número de mudanças entre caracteres (BROWN, 1994; MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001; WHELAN; LIÒ; GOLDMAN, 2001).

Em máxima parcimônia, há dois grupos de algoritmos ou seqüência de passos para a obtenção de árvores: exatos e heurísticos. Os algoritmos exatos por busca exaustiva enumeram todas as possíveis árvores estritamente bifurcadas para um dado número de seqüências em análise, testando as seqüências em todas as posições possíveis até o encontro das árvores de parcimônia, mas, dado o tempo computacional consumido neste processo, desenvolveu-se um algoritmo alternativo pelo qual as árvores sub-ótimas, ou seja, aquelas de maior número de passos, são eliminadas do conjunto de árvores, algoritmo este que recebeu

o nome de “branch-and-bound”, o qual acelera sensivelmente a obtenção de árvores (MIYAKI, RUSSO; PEREIRA, 2001).

O segundo grupo de algoritmos utilizado em máxima parcimônia são os algoritmos heurísticos, os quais, de um modo genérico, tem por princípio eliminar do cálculo de comprimento de árvores aquelas de baixa probabilidade de serem de máxima parcimônia, um procedimento simplificado e eficiente que sensivelmente diminui o tempo computacional gasto no processo, mas que pode não garantir a solução exata de uma determinada genealogia (MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001).

Para testar a confiabilidade de cada ramo que compõe uma dada árvore, o teste estatístico mais largamente aplicado é o “bootstrapping”, onde um conjunto de dados replicados é gerado por amostragem aleatória com reposição a partir da matriz de caracteres original criando novas matrizes de caracteres do mesmo tamanho da original, registrando-se a frequência de ocorrência de um dado ramo como o valor de “bootstrap” a ele referente (HILLIS; MABLE; MORITZ, 1996).

Considerando-se que as diarreias neonatais são fator de desequilíbrio para a exploração pecuária, consistindo em uma das mais frequentes doenças observadas em bovinos jovens, sendo o coronavírus bovino um dos principais agentes etiológicos de tais processos e que no Brasil são raros os dados acerca da ocorrência deste vírus, estudos que visem mensurar sua ocorrência através de métodos diagnósticos seguros são necessários. Ainda, a análise da diversidade genética do BCoV por meio da sequência de nucleotídeos do gene codificador da subunidade S1 da proteínas S é um meio objetivo para se observarem variações neste vírus, as quais podem levar ao melhor entendimento da epidemiologia e das relações entre diversas amostras de BCoV, fator essencial ao delineamento de medidas preventivas.



## 2 OBJETIVOS

- Detectar, pela técnica da hemaglutinação confirmada pela técnica de inibição da hemaglutinação, a ocorrência de coronavírus bovino (BCoV) em amostras de fezes de bezerros com diarreia e bezerros sem diarreia.
- Padronizar uma técnica de RT-PCR para a detecção do BCoV em amostras de fezes de bezerros.
- Comparar os resultados obtidos com a técnica de RT-PCR padronizada com a prova de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação na detecção de coronavírus bovino (BCoV) em amostras de fezes de bezerros para avaliar a concordância entre as duas provas.
- Determinar a identidade média de nucleotídeos para a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S dos BCoV a partir de seqüenciamento do DNA correspondente à mesma.
- Propor uma genealogia para os coronavírus bovinos com base na seqüência de nucleotídeos da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S dos BCoV encontrados.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS FECAIS

Foram colhidas 203 amostras de fezes de bezerros em 19 propriedades leiteiras distribuídas entre os Municípios de Descalvado, Porto Feliz, Assis, São João da Boa Vista, São Paulo, Presidente Epitácio, Bragança Paulista, Barueri, Nova Odessa, Atibaia, Viradouro, Cravinhos e São Miguel Arcanjo no Estado de São Paulo e Passos no Estado de Minas Gerais (Anexo A), com número médio de 10,7 amostras por propriedade, variando de 1 a 24 amostras, entre abril de 2000 e junho de 2002. As amostras foram colhidas tanto de animais com diarreia quanto de animais saudáveis com idades entre 1 dia e 6 meses, diretamente do reto e conservadas a -20°C até o momento dos testes.

Tomou-se por definição de caso de diarreia a ocorrência de defecação líquida no momento da colheita e/ ou o relato de tal ocorrência por parte do proprietário, médico veterinário ou tratador do animal em questão. Para todos os testes realizados para detecção de coronavírus, as amostras foram preparadas como suspensões a 20% em PBS 0,01M/ BSA 0,1% pH 7,2 e clarificadas a 12.000 x g/ 30' a 4 °C, tomando-se o sobrenadante como amostra.

#### 3.2 AMOSTRA PADRÃO DE CORONAVÍRUS BOVINO

Para utilização como controle positivo em todas as reações de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação, PCR e seqüenciamento, a amostra padrão Kakegawa de coronavírus bovino (AKASHI et al., 1980) foi cultivada em células da linhagem HmLu-1 (pulmão de hamster) em sistema “roller”.

Monitoradas pela reação de hemaglutinação (item 3.3) e titulação por “end point” em HmLu-1 , as culturas mostraram títulos de até 512 e  $10^3$ , respectivamente.

### 3.3 PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO/ INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA/HI) PARA DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS BOVINO

A presença de coronavírus bovino foi investigada pela técnica da hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação em todas as 203 amostras colhidas de acordo com o descrito por Jerez et al. (2002).

#### 3.3.1 Produção de soro hiperimune anti-coronavírus bovino

O soro hiperimune anti-coronavírus bovino foi obtido por inoculação intramuscular da amostra Kakegawa produzida conforme o item 3.2 em carneiro. Foram administradas 4 doses em intervalos semanais em um volume de 50mL de sobrenadante de cultura de células inoculadas com coronavírus bovino/ dose. O soro foi separado do sangue total colhido por punção da veia jugular 15 dias após a última inoculação. Para retirada dos inibidores inespecíficos, o soro hiperimune anti-coronavírus foi tratado com uma solução de caolim a 25% em tampão borato 0,5 M pH 9,0 e inativado a 56 °C durante 30 minutos. Após centrifugação a 1000 x g durante 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi tratado com “papa” de hemácias de hamster durante 1 hora em banho de gelo para a retirada das hemaglutininas inespecíficas. Os eritrócitos foram removidos por centrifugação a 1000 x g durante 5 minutos a 4 °C, colhendo-se o sobrenadante.

O título de anticorpos inibidores da hemaglutinação foi encontrado diluindo-se o soro tratado em base 2 com PBS 0,01M/ BSA 0,1% pH 7,2 em microplaca com fundo em V em volumes de 25µL/ diluição, adicionando-se a cada poço 25µL da amostra padrão Kakegawa

contendo 4 UHA (unidades hemaglutinantes), incubando-se a reação a 37 °C. Após a incubação, adicionaram-se 25 µL de suspensão de hemácias de hamster a 0,4% (em PBS 0,01M/BSA 0,1% pH 7,2), sendo o título lido como o inverso da última diluição na qual se observou inibição da hemaglutinação, título este tomado como 1 UIHA (unidade inibidora da hemaglutinação) após 2 horas de incubação à temperatura ambiente.

Ao final, o soro titulado foi diluído para uso de modo que contivesse 8 UIHA em PBS 0,01M/BSA 0,1% pH 7,2.

### 3.3.2 Prova de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação (HA/HI)

Para a triagem por hemaglutinação, as suspensões fecais foram diluídas em base 2 em duplicata em PBS 0,01M/ BSA 0,1% pH 7,2 em placas com fundo em U com 96 poços em um volume final de 25µL/ diluição, adicionando-se 25 µL de suspensão de hemácias de hamster a 0,4% em PBS 0,01M/BSA 0,1% pH 7,2 a cada poço. A amostra Kakegawa de coronavírus bovino foi utilizada como controle positivo, enquanto que PBS 0,01M/ BSA 0,1% pH 7,2 foi utilizado como controle negativo. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, os títulos foram tomados como o inverso da última diluição onde se observou hemaglutinação.

As amostras com títulos hemaglutinantes superiores a 4 foram testadas para confirmação na inibição da hemaglutinação em placas de 96 poços com fundo em V, diluindo-se as suspensões fecais em duplicata em PBS 0,01M/ BSA 0,1% pH 7,2 em base 2 para um volume final de 25 µL/diluição, adicionando-se 25 µL de soro policlonal de carneiro hiperimune (item 3.3.1) para BCoV com 8 UIHA. Após 1 hora de incubação a 37 °C, 25 µL de suspensão de hemácias de hamster a 0,4% em PBS 0,01M/ BSA 0,1% pH 7,2 foram adicionados a cada poço e a reação foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente,

tomando-se os títulos como o inverso da última diluição na qual ocorreu hemaglutinação, considerando positivas as amostras com queda mínima no título de 4 unidades hemaglutinantes (UHA) entre as provas de HA e HI (SATO et al.,1977).

#### 3.4 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE PCR PARA DETECÇÃO DO GENE CODIFICADOR DA RNA-POLIMERASE-RNA DEPENDENTE DOS CORONAVÍRUS (PCR *POL*)

Foi desenvolvida uma reação de triagem baseada em *nested* RT-PCR para a detecção de um segmento de 136 pb do gene *pol*, localizado na ORF1b, altamente conservada entre os três sorogrupos existentes de coronavírus, a partir dos primers 4Bm e 2Bp e condições descritas por Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999). As amostras que resultassem positivas para tal reação de triagem seriam, então, testadas para o gene codificador da proteína S e subsequente seqüenciamento parcial do mesmo.

Primers internos ao segmento de 251pb previsto na reação acima citada (Figura 1) foram desenhados a partir de seqüências parciais do gene *pol* de coronavírus do grupo 2 encontradas no Genbank referentes ao coronavírus bovino, coronavírus humano OC-43, vírus hemaglutinante da encefalite suína e vírus da sialodacrioadenite dos ratos (números de acesso AF 124985, AF 124989, AF 124988 e AF 124990). As seqüências foram alinhadas pelo programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall) e os primers foram desenhados com o auxílio do programa Oligo (© 1999-2003 Molecular Biology Insights, Inc.), obtendo-se um par de primers degenerados denominados de CV2L (primer antisenso 5' AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA 3') e CV2U (primer senso 5' TACTATGACTGGCAGAATGTTTCA 3'), com um produto esperado de 136 pb (Figura 1). Cada primer foi submetido ao BLASTn para pesquisa das seqüências mais similares e possíveis similaridades não relacionadas ao gênero *Coronavirus*, não tendo sido encontradas seqüências de maior escore do que aquelas referentes ao gene *pol* dos coronavírus do grupo 2.

Temperaturas ótimas de hibridação dos primers foram encontradas testando os mesmos em gradiente de temperatura (Quadro 2) em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient® com a amostra BCoV Kakegawa como referência. A transcrição reversa (síntese de cDNA) foi realizada a 42°C/60' em um mix contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/μL de cada primer (CV2L e CV2U), 7 μL de RNA extraído pelo método do TRIzol (Invitrogen™) (de acordo com as instruções do fabricante e denaturados a 95°C/5') e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para uma reação final de 20μL.

A seguir, 5 μL de cDNA assim obtido foram adicionados ao PCR mix (1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada primer (CV2L e CV2U), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 25,25 μL de água ultra-pura e 1,25U Taq DNA polimerase para uma reação final de 50μL e submetidos a 35 ciclos de 94°C/1' para denaturação do DNA, 53°C com 5°C de gradiente/1,5' para hibridação dos primers e 72°C/1' para extensão do DNA e, após o ciclo, 72°C/10' para extensão final.

Os procedimentos acima descritos evidenciaram que a temperatura ideal para a fase de hibridação dos primers CV2U e CV2L é de 54,8 °C , visto que nesta se obteve um sinal mais evidente em gel de agarose a 1,5 % e coloração por brometo de etídio a 0,5 μg/mL.

Temperatura de hibridação
48 °C
48,2 °C
48,7 °C
49,9 °C
50,7 °C
52 °C
53,4 °C
54,8 °C
56,1 °C
57,1 °C

Quadro 2 – Temperaturas utilizadas em termociclador de gradiente Eppendorf Mastercycler Gradient® para determinação de temperaturas ótimas de hibridação de primers - São Paulo - 2003

O passo seguinte foi o estudo do limiar de detecção dos primers CV2L e CV2U quando utilizados em *nested* após uma primeira amplificação com os primers 2Bp e 4Bm descritos por Stephensen, Casebolt e Gangopadhyay (1999). Para tanto, foi feita uma reação de *nested* RT-PCR na qual foi testada a amostra BCoV-Kakegawa com título hemaglutinante 32 diluída de 1:2 a 1:256 em TRIS 10mM/ EDTA 1mM pH 8,0 (TE) e paralelamente em suspensão de fezes (negativa para BCoV por HA/HI) em PBS 0,01M/BSA 0,1% pH 7,2 com o intuito de se avaliar a interferência de inibidores de PCR presentes nas fezes. Como controle positivo, a amostra padrão não diluída foi testada em duplicata e, como controle negativo, foi utilizado TE. Especificamente na reação *nested*, foram incluídas amostras de água ultra-pura a cada três amostras para monitorar a ocorrência de contaminações. Incluiu-se também entre estas amostras a mesma suspensão fecal utilizada como diluente para assegurar a negatividade da mesma.

A transcrição reversa foi realizada a 42°C/60' em um mix contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen<sup>TM</sup>), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/μL de cada primer (2Bp e 4Bm), 7 μL de RNA extraído pelo método do TRIzol (Invitrogen<sup>TM</sup>) (de acordo com as

instruções do fabricante e denaturados a 95°C/5') e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para uma reação final de 20µL.

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

A fase de *nested*-PCR foi realizada com 5 µL do produto da primeira PCR assim obtido adicionados ao mix contendo 1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada primer CV2L e CV2U, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 25,25 µL de água ultra-pura e 1,25U Taq DNA polimerase) e submetidos a 26 ciclos de 94°C/1', 54,8 °C /1,5' (temperatura encontrada como ótima para este par de primers) e 72°C/1' seguidos por 72°C/10' para extensão final.

A reação de PCR padronizada para a detecção do gene *pol* de BCoV foi aplicada a todas as 203 amostras fecais colhidas, utilizando exatamente as concentrações de reagentes e ciclos descritos para a transcrição reversa, primeira amplificação e *nested* PCR acima no estudo do limiar de detecção, incluindo, a cada reação, a amostra padrão Kakegawa de BCoV como controle positivo e o PBS 0,01M/ BSA 0,1 % pH 7,2 como negativo; ainda, na reação *nested*, foi incluído um tubo com água ultra-pura a cada três amostras, processado em conjunto com estas, com o intuito de se monitorarem contaminações por DNA amplificado.

### 3.5 COMPARAÇÃO ENTRE PCR PARA O GENE *POL* E HA/HI PARA A DETECÇÃO DE BCoV

A comparação entre as provas de HA/HI e PCR para o gene *pol* foi realizada aplicando-se os testes Kappa e J de Youden com nível de confiança de 99,5% aos resultados



dos testes de HA/HI e PCR *pol* referentes às 203 amostras fecais e 19 propriedades rurais com o programa WinEpiscope 2.0 (© 2001, Blas, Ortega, Frankena, Noorhuizen e Thrusfield).

### 3.6 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE PCR PARA A REGIÃO HIPERVARIÁVEL DO GENE CODIFICADOR DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV (PCR S1)

Desenvolveu-se uma reação de PCR cujo fragmento amplificado continha a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S (BRANDÃO et al., 2003) a ser aplicada às amostras que se apresentassem positivas à PCR para o gene *pol* anteriormente descrita, sendo os fragmentos amplificados submetidos ao seqüenciamento de DNA para a reconstrução da genealogia das amostras em estudo.

Para tanto, utilizando o programa Primer Premier 5.0 (© 2003 Premier Biosoft International), dois pares de primers foram desenhados para regiões conservadas flanqueando a região hipervariável descrita por Hasoksuz et al. (2002) (Figura 1) do gene S das seqüências de coronavírus bovino de números de acesso GenBank AF058942.1, U06090.1, AF239306.1, M80844, U00735.2, M64667.1 e M64668.1 alinhadas pelo método CLUSTAL/W utilizando o programa Bioedt v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall): primers externos (senso S1HS 5'-CTATACCCAATGGTAGGA-3' e anti-senso S1HA 5'-CTGAAACACGACCGCTAT-3') com um produto esperado de 885pb (nt 1204 a 2088 do gene S ) e primers internos (senso S1NS 5'-GTTTCTGTTAGCAGGTTTAA-3' e anti-senso S1NA 5'-ATATTACACCTATCCCCTTG-3') com um produto esperado de 488pb (nt 1329 a 1816 do gene S gene, interno ao produto da primeira PCR ) (Figura 1). Cada primer foi submetido ao BLASTn para pesquisa das seqüências mais similares e possíveis similaridades não relacionadas ao BCoV, não tendo sido estas últimas encontradas.

Temperaturas ótimas de hibridação (Quadro 2) para cada um dos pares de primers foram encontradas testando os mesmos em gradiente de temperatura em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient® com a amostra BCoV Kakegawa como referência.

A transcrição reversa foi realizada a 42°C/60' em um mix contendo 1 x First Strand Buffer (Invitrogen™), 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1pmol/μL de cada primer (S1HS e S1HA ou S1NS e S1NA), 7 μL de RNA extraído pelo método do TRIzol (Invitrogen™) (de acordo com as instruções do fabricante e denaturados a 95°C/5') e 200U de M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™) para uma reação final de 20μL.

A seguir, 5 μL de cDNA assim produzido foram adicionados ao PCR mix (1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/μL de cada primer (S1HS e S1HA ou S1NS e S1NA), 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 25,25 μL de água ultra-pura e 1,25U Taq DNA polimerase para uma reação final de 50μL e submetidos a 35 ciclos de 94°C/1' para denaturação do DNA, 53°C com 5°C de gradiente/1.5' para hibridação dos primers e 72°C/1' para extensão do DNA, seguindo-se 72°C/10' para extensão final após o ciclo. As temperaturas ótimas de hibridação (53,4 °C para os primers externos e 58,4°C para os internos) foram eleitas como sendo aquelas onde se produziram os mais evidentes fragmentos de 885pb (para os primers externos) ou 488pb (primers internos) em relação às temperaturas testadas (Quadro 2) em eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio a 0,5 μg/mL.

O limiar de detecção para os primers externos S1HS e S1HA foi encontrado testando a amostra BCoV Kakegawa diluída em base 2 em uma suspensão de fezes negativa para BCoV (previamente testada por HA/HI) em PBS 0,01M/ BSA 0,1% pH 7,2 com a transcrição reversa e PCR conforme descrito acima, exceto que a temperatura de hibridação foi de 53,4°C.

O limiar de detecção para os primers internos S1NS e S1NA foi testado diluindo-se a amostra BCoV Kakegawa (Título HA = 256) em base 2 em uma suspensão de fezes negativa

para BCoV (previamente testada por HA/HI) em PBS 0,01M/BSA 0,1% pH 7.2, procedendo-se a transcrição reversa e a primeira amplificação conforme descrito acima com os primers S1HA e S1HS e seguindo-se a reação de *nested*-PCR com os primers internos com a temperatura de hibridação encontrada no gradiente de temperatura (58,4 °C) e 5µL do produto de PCR dos primers externos aplicados às concentrações de reagentes descritas. Incluiu-se também entre estas amostras a mesma suspensão fecal utilizada como diluente, com o intuito de se assegurar a negatividade da mesma.

A reação de *nested* RT-PCR assim padronizada foi aplicada às amostras que se apresentaram positivas para a PCR de triagem dirigida ao gene *pol*, utilizando as concentrações de reagentes acima descritas e a temperatura de hibridação ótima encontrada para os primers, incluindo, a cada reação, a amostra padrão Kakegawa de BCoV como controle positivo e o PBS 0,01M/ BSA 0,1 % pH 7,2 como negativo; ainda, na reação *nested*, foi incluído um tubo com água ultra-pura a cada três amostras, processado do mesmo modo que estas, com o intuito de se monitorarem contaminações por fragmentos amplificados, o que poderia gerar falso-positivos.

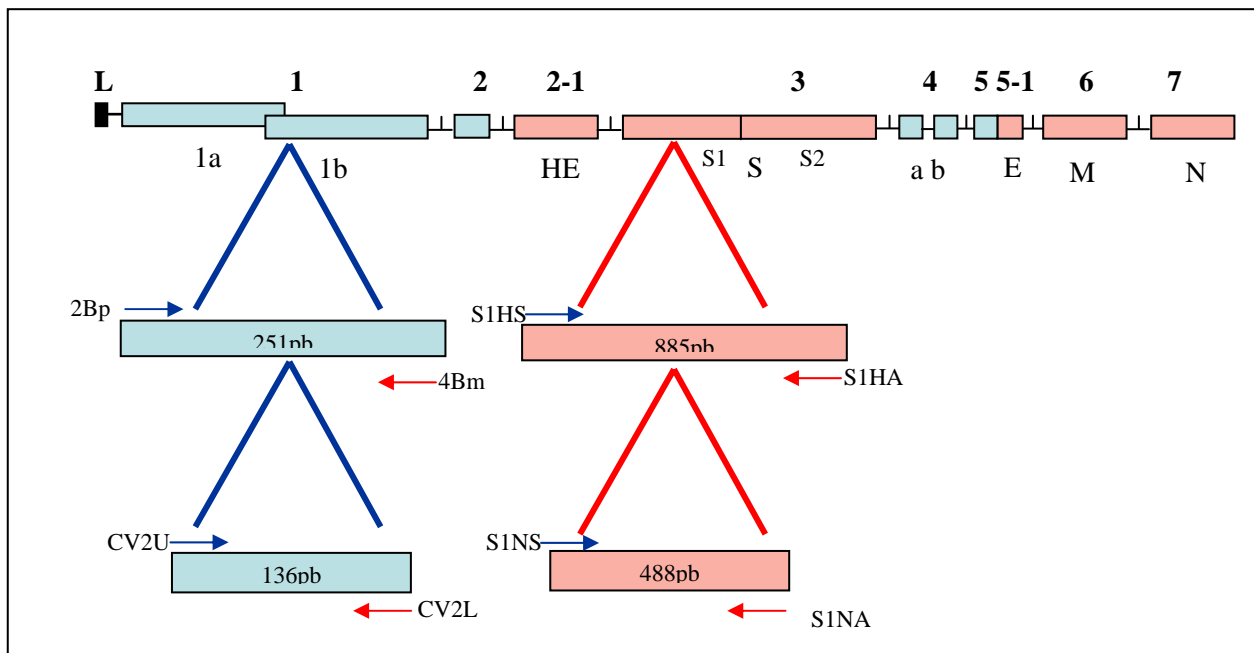


Figura 1 – Representação esquemática do genoma dos coronavírus e das regiões amplificadas pela PCR *pol* (primers 2Bp + 4Bm e CV2L + CV2U) e pela PCR S1 (primers S1HS + S1HA e S1NS + S1NA) (adaptado de LAI; CAVANAGH, 1997) - São Paulo - 2003

### 3.7 PESQUISA DE ROTAVÍRUS NAS AMOSTRAS FECAIS PELA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

A presença de rotavírus foi pesquisada com o intuito de avaliar a existência de co-infecções por coronavírus bovino e rotavírus, um aspecto ligado à ecologia do BCoV na microbiota intestinal.

Das 203 amostras de fezes colhidas, 119 tiveram quantidade suficiente para serem pesquisadas quanto à presença de rotavírus pela prova de eletroforese em gel de poliácridamida (HERRING et al., 1982), as quais estavam distribuídas em 14 propriedades rurais. Suspensões fecais a 20% foram preparadas em tampão TRIS 0,01M/ CaCl<sub>2</sub> 0,0015M pH 7,3, centrifugando-se a 12000 x g/ 30', extraíndo-se o RNA do sobrenadante com fenol-clorofórmio, procedendo-se a eletroforese em gel de poliácridamida descontínuo a 3,5%/7,5%

e corando-se com nitrato de prata. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram padrão de migração das bandas de RNA similares aos observados à amostra NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus) de rotavírus (WHITE; MEBUS; TWIEHAUS, 1970) incluída como controle positivo.

### 3.8 SEQÜENCIAMENTO DE DNA

O fragmento de 488 pb contendo a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 obtido para cada amostra conforme o item 3.6 foi purificado dos géis de agarose com o kit Concert (Invitrogen™), quantificado visualmente com Low Mass DNA Ladder (Invitrogen™) de conformidade com as instruções do fabricante e submetido ao seqüenciamento de DNA em seqüenciador automático ABI-310 ou ABI-377 (Applied Biosystems™).

A reação de seqüenciamento consistiu em 4 µL de BigDye 3 (Applied Biosystems™), 4 µL de 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems™), 4 pmol de cada primer S1NS e S1NA em reações separadas, 10 ng do DNA alvo e água ultra-pura em quantidade suficiente para uma reação final de 20µL, levando-se ao termociclador PTC-200 (MJ Research™) para 35 ciclos de 96 °C/30 segundos, 50 °C/15 segundos e 60°C/4 minutos, com rampa de 0,7°C/segundo entre cada temperatura.

A seguir, o produto desta reação foi precipitado à temperatura ambiente com 80µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12.000 x g/ 25' a 25 °C, removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g/5' a 25 °C e secando-se o precipitado a 95 °C durante 5 minutos, sendo o pellet armazenado a -20 °C.

### 3.9 ANÁLISE GENEALÓGICA

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

As árvores genealógicas foram construídas com as seqüências de nucleotídeos consensuais de cada amostra alinhadas pelo método CLUSTAL/W com o programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall) após a aferição do passo de leitura, conferindo-se manualmente o alinhamento. A região do alinhamento utilizada para a genealogia e representada na figura 2 foi editada, mantendo-se as regiões de alinhamento entre todas as seqüências em passo de leitura aferido e excluindo os nucleotídeos referentes aos primers utilizados na reação de seqüenciamento, obtendo-se a árvore de máxima parcimônia consenso através do algoritmo heurístico “branch-swapping” e os valores de “bootstrap” com 1000 repetições com o programa PAUP 4.0 b10 (© 2000 Smithsonian Institution), tendo sido os *gaps* considerados como um quinto nucleotídeo.

Foram incluídas na genealogia 10 seqüências homólogas às aqui estudadas recuperadas do GenBank provenientes de coronavírus bovino de bezerros da França, do Canadá e dos EUA (Quadro 3), bem como a amostra Kakegawa do Japão aqui seqüenciada. Para a árvore enraizada, foi incluída como grupo externo a seqüência de nucleotídeos do gene codificador da proteína S da amostra B145 de bredavírus, pertencente ao gênero *Torovirus*, sendo a árvore obtida com algoritmo heurístico “branch-swapping”.

As identidades de nucleotídeos entre as seqüências alinhadas foram calculadas com o programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall). O alinhamento pelo método CLUSTAL/W e a similaridade entre as seqüências de aminoácidos preditas para cada seqüência de nucleotídeos foram obtidos com a matriz BLOSUM62 dentro do programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall) a partir da tradução das seqüências de nucleotídeos desprovidas de *gaps* e a estrutura secundária das proteínas correspondentes à tradução em aminoácidos das seqüências de nucleotídeos geradas foi realizada com o programa NNPredict via Internet na página <http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html> com as seqüências em aminoácidos desprovidas de *gaps*.

GENBANK	Amostra	País	Primeira citação	Ano de seqüenciamento	Origem do vírus seqüenciado
AF391541.1	BCoV-ENT	USA	1997	2001	HRT-18G (até 2 passagens)
AF058942.1	LY-138	USA	1965	2000	Passagem oral em bezerras
AF058944.1	OK-0514-3	USA	1996	1998	HRT-18G (até 5 passagens)
AF239307.1	BCQ1523	Canadá	1994	2000	HRT-18G (até 5 passagens)
U06092.1	BCQ20	Canadá	1989	1994	HRT-18 (até 5 passagens)
U06091.1	BCQ9	Canadá	1989	1994	HRT-18 (até 5 passagens)
U00735.2	Mebus	USA	1972	2003	BFK, MDBK
U06093.2	BCQ571	Canadá	1989	2001	HRT-18 (até 5 passagens)
D000731.1	BCV-F15	França	1979	1990	HRT-18
M64668.1	BCV Norden	USA	Não encontrada	1991	Vacinal
AJ575373.1	Bredavirus B145	Holanda	Não encontrada	2003	Não encontrada

Quadro 3 – Seqüências de coronavírus bovino e bredavírus recuperadas do GenBank utilizadas para a reconstrução da genealogia de coronavírus detectados em bezerras no Brasil segundo número de acesso GenBank, nomenclatura da amostra, país de origem, ano da primeira citação em literatura, ano de realização do seqüenciamento e origem do vírus seqüenciado - São Paulo - 2003

## 4 RESULTADOS

### 4.1 APLICAÇÃO DA PROVA DE HEMAGLUTINAÇÃO/ INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HA/HI) PARA DETECÇÃO DE CORONAVÍRUS BOVINO

A aplicação da técnica de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação nas 203 amostras demonstrou uma frequência de BCoV de 35,47 % (72/203) em relação às amostras individuais e de 73,68% (14/19) em relação às propriedades rurais, considerando-se como positiva a propriedade rural com ao menos uma amostra positiva. Os resultados referentes a esta prova com relação à presença ou ausência de diarreia nas propriedades e nos animais encontram-se expostos nas Tabelas 1 e 2.

Propriedades e animais dos quais não se tinham informações acerca da ocorrência de diarreia foram classificados como “diarreia desconhecida”. Esta classe foi gerada pela ausência do envio de dados precisos anexados às amostras pelos médicos veterinários de campo.

### 4.2 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR DIRIGIDA AO GENE *POL* PARA A DETECÇÃO DE BCoV NAS AMOSTRAS FECAIS

O teste de limiar de detecção da PCR dirigida ao gene *pol* produziu resultados positivos em gel de agarose a 1,5% corado por brometo de etídio após a reação de nested-PCR (bandas de 136 pb) para os controles positivos e para as diluições de BCoV padrão até a diluição 1:128; o controle negativo de TE, bem como as alíquotas de água ultra pura incluídas como controle na fase de nested, não resultaram em quaisquer bandas.

A primeira amplificação correspondente a estas mesmas amostras evidenciou em gel de agarose a 1,5 % resultados positivos (bandas de 251 pb) apenas na amostra não diluída e na diluição 1:2.



Quando o procedimento foi repetido substituindo-se o TE como diluente por uma suspensão em PBS/BSA de fezes negativas para BCoV por HA/HI com o intuito de verificar a interferência de inibidores de PCR nas fezes, os mesmos resultados foram encontrados, destacando que a respectiva amostra utilizada como diluente também foi testada na descrita reação, tendo resultado negativa tanto na primeira quanto na segunda (*nested*) ampliações.

A reação de PCR padronizada para a detecção de BCoV através do gene *pol* foi aplicada a todas as 203 amostras fecais de bezerros, resultando em uma frequência de BCoV de 25,12% (51/203) em relação às amostras individuais e 52,63% (10/19) em relação às propriedades, considerando-se como positiva a propriedade com ao menos uma amostra positiva. Os resultados referentes a esta prova com relação à presença ou ausência de diarreia nas propriedades rurais e nos animais encontram-se expostos nas tabelas 1 e 2.

Propriedades e animais dos quais não se tinham informações acerca da ocorrência de diarreia foram classificados como “diarreia desconhecida”. Não se observaram contaminações entre amostras, como evidenciado pela ausência de bandas em gel de agarose nas reações referentes ao PBS controle negativo incluído a cada reação e aos controles negativos da reação *nested*.

Tabela 1 – Frequência de positividade das amostras fecais dos animais às provas de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação (HA/HI) e PCR dirigida ao gene *pol* para a detecção de coronavírus bovino e PAGE para detecção de rotavírus - São Paulo - 2003

	ANIMAIS COM DIARRÉIA	ANIMAIS SEM DIARRÉIA	ANIMAIS DIARRÉIA DESCONHECIDA	TOTAL
HA/HI positivas	36,4% (8/22)	49,5% (46/93)	20,5% (18/88)	35,47% (72/203)
PCR positivas	9,1% (2/22)	18,28% (17/93)	36,4% (32/88)	25,12% (51/203)
HA/HI + PCR positivas	0% (0/22)	8,6% (8/93)	9,1% (8/88)	7,9% (16/203)
Rotavírus	40% (6/15)	20% (3/15)	40% (6/15)	12,6% (15/119)

Tabela 2 – Freqüência de positividade das amostras fecais por propriedades rurais às provas de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação (HA/HI) e PCR dirigida ao gene *pol* para a detecção de coronavírus bovino e PAGE para detecção de rotavírus - São Paulo - 2003

	PROPRIEDADES COM DIARRÉIA	PROPRIEDADES SEM DIARRÉIA	PROPRIEDADES DIARRÉIA DESCONHECIDA	TOTAL
HA/HI positivas	85,7% (6/7)	80,0% (4/5)	57,1% (4/7)	73,68% (14/19)
PCR positivas	57,1% (4/7)	40,0% (2/5)	57,1% (4/7)	52,63% (10/19)
HA/HI + PCR positivas	57,1% (4/7)	20,0% (1/5)	28,6% (2/7)	36,84 (7/19)
Rotavírus	50,0% (3/6)	0% (0/3)	20,0% (1/5)	28,57% (4/14)

#### 4.3 PADRONIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE PCR PARA A REGIÃO HIPERVARIÁVEL DO GENE CODIFICADOR DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S DO BCoV

No teste de limiar de detecção para os primers internos e externos, foram observadas bandas evidentes de 885 pb e 488 pb até a diluição 1:2, sendo que os controles de *nested*, o PBS 0,01 M BSA 0,1% pH 7,2 usado como controle negativo e as amostras fecais utilizadas como diluentes não apresentaram bandas. Nenhuma banda inespecífica foi observada nos géis de agarose. O BLASTn demonstrou ser o gene S de BCoV como a seqüência de maior escore, sem outras seqüências relacionadas aos primers testados.

A reação de PCR destinada a amplificar parte da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S para posterior seqüenciamento foi aplicada às 51 amostras que se apresentaram positivas para a PCR de triagem dirigida ao gene *pol*, resultando em 17 amostras positivas para o fragmento esperado de 488 pb. Não se observaram contaminações entre amostras, como evidenciado pela ausência de bandas em gel de agarose nas reações referentes ao PBS controle negativo incluído a cada reação e aos controles negativos das reações *nested*.

#### 4.4 SEQÜENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE GENEALÓGICA

Quinze amostras de 17 positivas para a PCR S1 tiveram o produto desta reação seqüenciado, bem como a amostra padrão Kakegawa (amostras 10-01, 17-01, 19-01, 23-01, 25-01, 33-01, 35-01, 31-02, 37-02, 44-02, 52-02, 55-02, 64-02, 65-02 e 66-02). Das amostras 12-01 e 15-01, não foram obtidas seqüências viáveis. O alinhamento das seqüências acima citadas com aquela descrita por Hasoksuz et al (2002), aqui referida como U00735.2 e a análise por BLASTn de cada uma delas demonstra que a região seqüenciada realmente se encontra dentro da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1, conferindo sustentação ao alinhamento.

A identidade média de nucleotídeos no segmento de 330 bases (Figura 2) correspondente aos nucleotídeos das posições 1381 a 1710 do gene S da amostra Mebus (U00735.2) entre as 15 amostras de coronavírus integrantes do presente estudo foi de 98,34%, com identidade mínima de 89,1% e máxima de 100%. Quando estas 15 amostras foram comparadas às amostras disponíveis no GenBank (Quadro 3), houve média de 92,74% de identidade com as 5 amostras originárias dos EUA, com identidade mínima de 90,3% e máxima de 97,8%. A comparação entre as 15 amostras brasileiras e 4 amostras canadenses resultou numa identidade média de nucleotídeos de 91,59%, com mínima de 89,7% e máxima de 96,3%. Em relação à amostra francesa BCV-F15, única deste país disponível no GenBank, a identidade média de nucleotídeos foi de 93,32%, com mínima de 92,4% e máxima de 95,57%. A amostra Kakegawa de coronavírus bovino, proveniente do Japão, cuja seqüência de nucleotídeos de parte da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S foi determinada no presente estudo, sem que existam seqüências referentes à mesma no GenBank, mostrou uma identidade média de nucleotídeos de 99,17%, com identidade mínima de 90 e máxima de 100% com as 15 amostras brasileiras. Os resultados do

cálculo de identidades entre as 15 seqüências aqui apresentadas e aquelas oriundas dos diversos países encontram-se expostos na tabela 3.

Tabela 3 – Identidades médias, máximas e mínimas de nucleotídeos para a região de alinhamento de um segmento de 330 bases da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S de 15 amostras de coronavírus bovino pertencentes ao presente estudo, seqüências das 10 amostras de BCoV citadas no quadro 1 e da amostra Kakegawa de coronavírus bovino, correspondendo aos nucleotídeos das posições 1381 a 1710 do gene S, tendo a amostra Mebus como referência, e identidades de nucleotídeos entre estas e a amostra B145 de bredavírus utilizada como grupo externo na genealogia - São Paulo - 2003

País	Brasil	EUA	Canadá	França	Japão
Brasil	98,34% (89,1-100%)	92,74% (90,3-97,8%)	91,59% (89,7%-96,3%)	93,32% (92,4-95,7%)	99,17% (90-100%)
EUA	-----	97,26% (96,3-99,3%)	97,09% (95,7-98,4%)	97,92% (96,9-98,7%)	92,64% (91,2-94,2%)
Canadá	-----	-----	97,35% (96-98,7%)	97,12% (96,3-98,1%)	91,42% (90,6-92,1%)
França	-----	-----	-----	100%	93,3%
Japão	-----	-----	-----	-----	100%
Bredavírus	42,85%	44, 14%	44,02% (43,5-	44,3%	42,8%
B145	(42,6-43,8%)	(43,8-44,6%)	44,6%)		

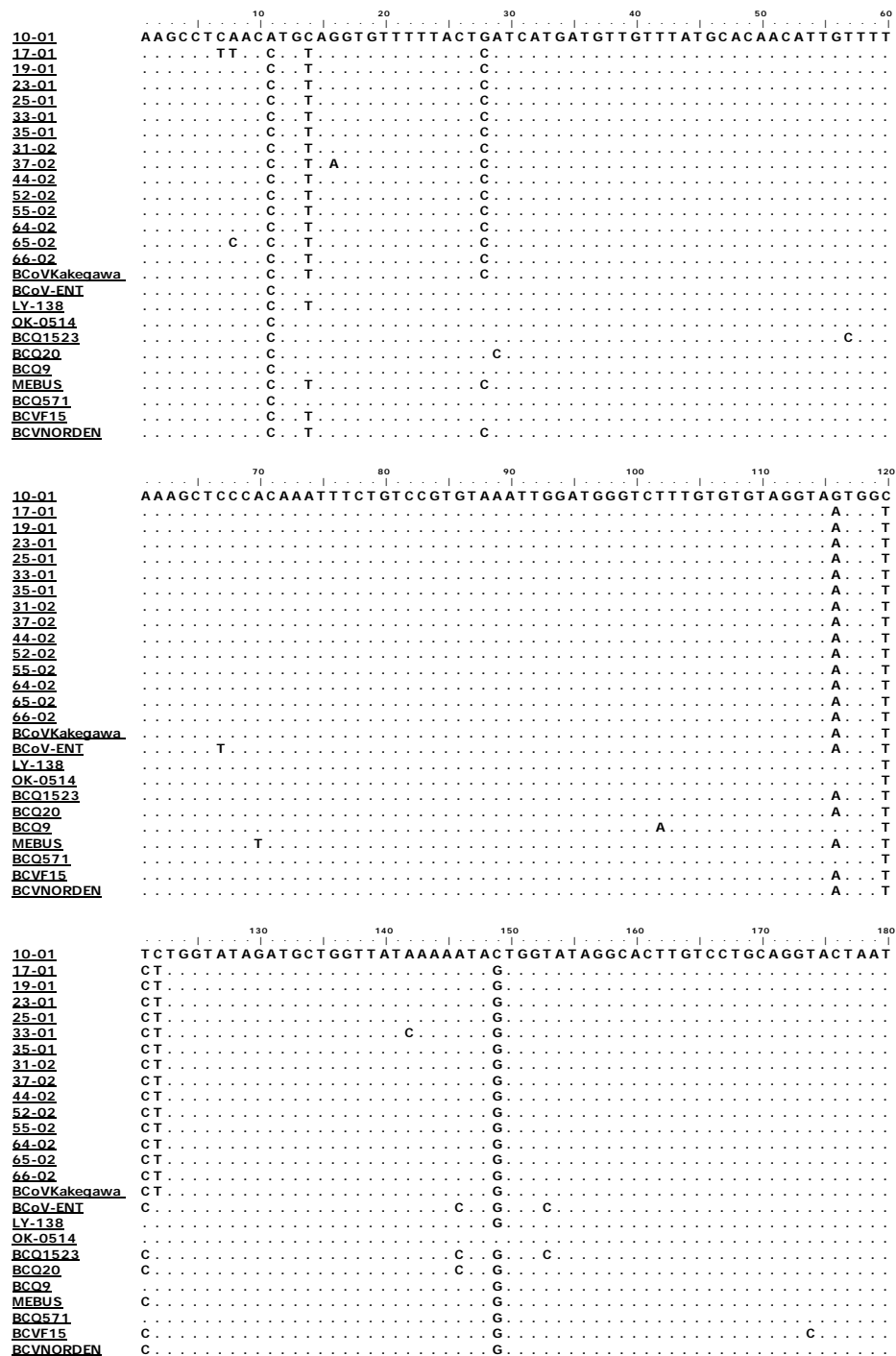
O alinhamento de nucleotídeos apresentado na Figura 2 evidenciou um *gap* de 18 nucleotídeos (ATGCTGC(C/T)CAATGT(A/G)(A/G)TT) da posição 197 à 214 do alinhamento, correspondente aos nucleotídeos de 1577 a 1594 do gene S, *gap* este observado em 14 das 15 amostras de campo seqüenciadas, sendo que a seqüência referente à amostra 10-01, única amostra brasileira a não apresentar o *gap*, teve identidade de até 100% com as amostras recuperadas do GenBank na região correspondente ao *gap*. Tal *gap* ocorre a partir do segundo nucleotídeo do códon 526 (AAT) e estende-se até o primeiro nucleotídeo do códon 531 (TGT) do gene S.

O alinhamento de aminoácidos preditos para as seqüências de nucleotídeos, correspondentes aos resíduos 461 a 570 tendo como modelo a amostra Mebus (U00735.2) demonstra que este *gap* de nucleotídeos resulta em um *gap* de 6 aminoácidos

(NAAQC(D/G/N)) nas posições de 66 a 71 do alinhamento de aminoácidos (Figura 3), correspondentes aos resíduos de 526 a 531 da proteína S, tendo ocorrido, também, uma substituição de C por S na posição imediatamente após o *gap*, compartilhada por todas as 14 amostras que apresentaram tal padrão.

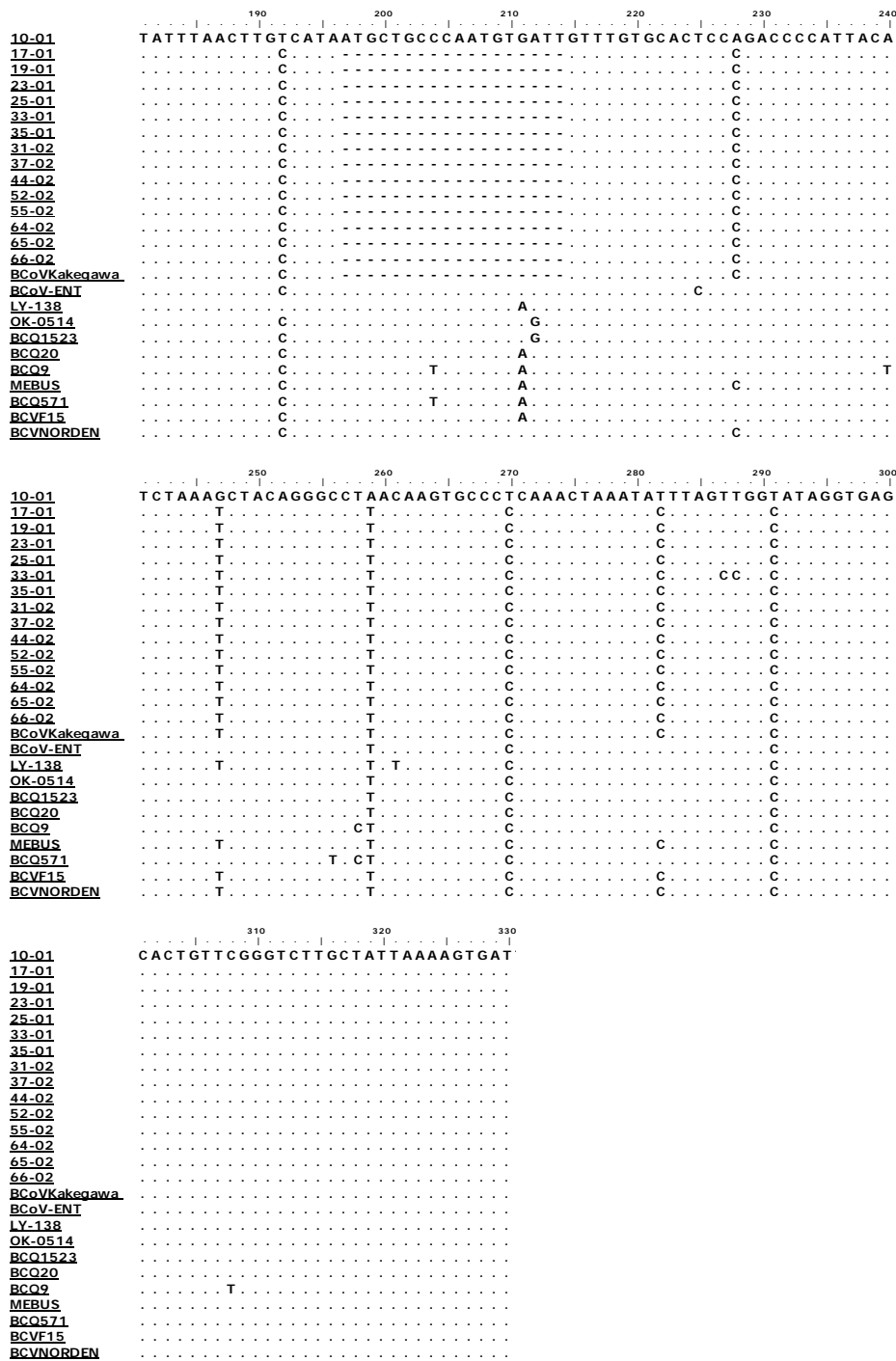
A similaridade média de aminoácidos entre as 15 amostras brasileiras foi de 98%, com similaridade mínima de 88% e máxima de 100%. Entre as seqüências provenientes dos EUA, a similaridade média para a região homóloga foi de 97%, variando de 96 a 98%, enquanto que entre as amostras canadenses, a similaridade média foi de 96,67% e variou de 96% a 98%.

Na região de alinhamento de nucleotídeos apresentada na figura 2, são evidentes 37 posições onde ocorrem substituições, das quais 21 são exclusivas de determinadas amostras e 16 são sítios que variam em mais de uma amostra (Quadros 4 e 5).



continua

Figura 2 – Alinhamento de nucleotídeos de um segmento de 330 bases da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S de coronavírus bovino correspondentes aos nucleotídeos das posições 1381 a 1710 do gene S, tendo a amostra Mebus como referência. As amostras 10-01, 17-01, 19-01, 23-01, 25-01, 33-01, 35-01, 31-02, 37-02, 44-02, 52-02, 55-02, 64-02, 65-02 e 66-02 referem-se às amostras de coronavírus bovino integrantes do presente estudo - São Paulo - 2003



conclusão

Figura 2 – Alinhamento de nucleotídeos de um segmento de 330 bases da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S de coronavírus bovino correspondentes aos nucleotídeos das posições 1381 a 1710 do gene S, tendo a amostra Mebus como referência. As amostras 10-01, 17-01, 19-01, 23-01, 25-01, 33-01, 35-01, 31-02, 37-02, 44-02, 52-02, 55-02, 64-02, 65-02 e 66-02 referem-se às amostras de coronavírus bovino integrantes do presente estudo - São Paulo - 2003

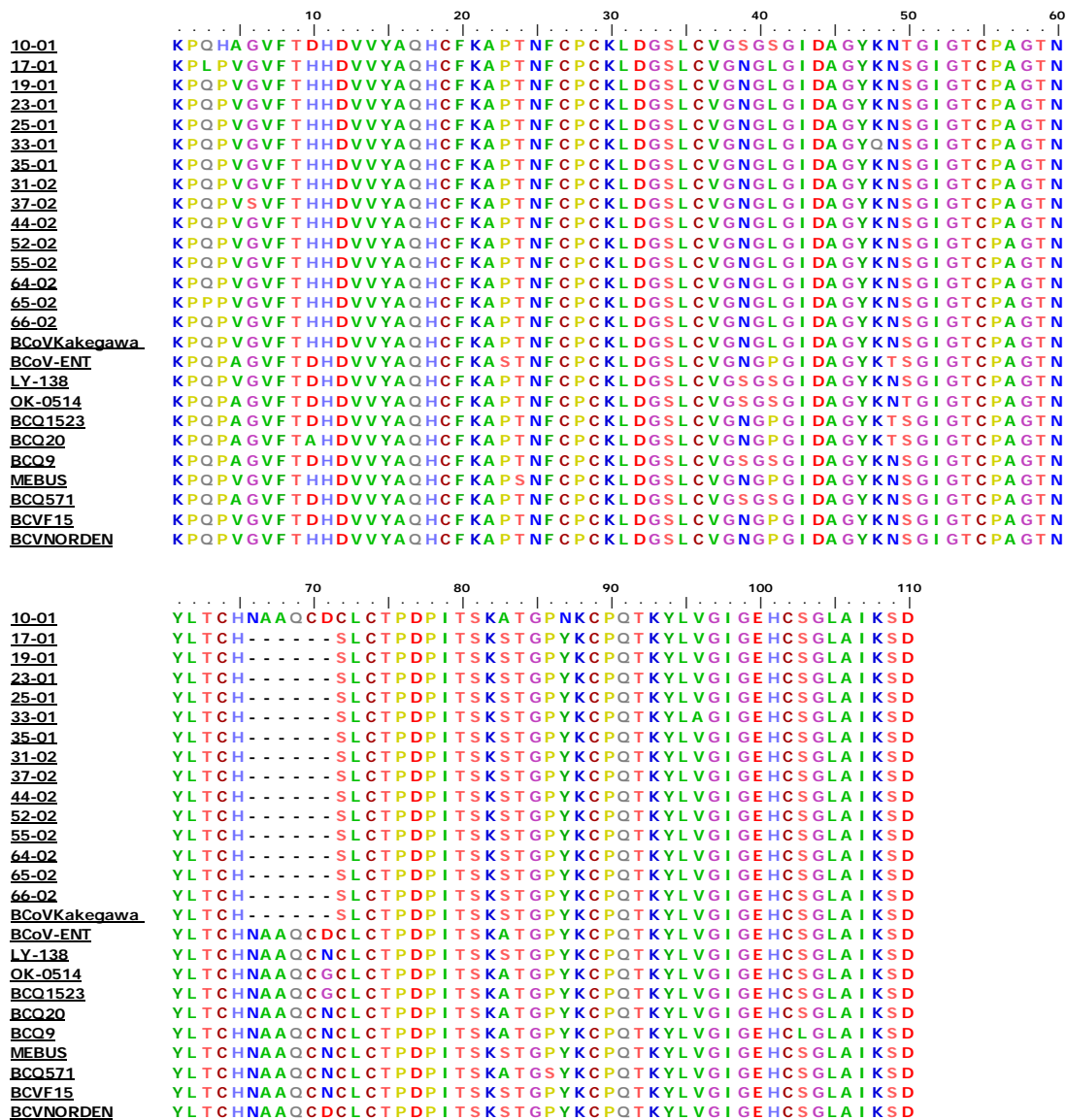


Figura 3 – Alinhamento de um segmento de 110 de aminoácidos da região hipervariável da subunidade S1 da proteína S de coronavírus bovino correspondentes aos resíduos das posições 461 a 570 da proteína S, tendo a amostra Mebus como referência. As amostras 10-01, 17-01, 19-01, 23-01, 25-01, 33-01, 35-01, 31-02, 37-02, 44-02, 52-02, 55-02, 64-02, 65-02 e 66-02 referem-se às amostras de coronavírus bovino integrantes do presente estudo - São Paulo - 2003



Amostra	Posição do códon	Substituição de nucleotídeos	Substituição de aminoácido	Nº substituições não-sinônimas	Nº substituições sinônimas
10-01	464	<b>CCT</b> → <b>CAT</b>	P→ H	1	0
	547	<b>TAC</b> → <b>AAC</b>	Y→ N	1	0
	550	<b>CCC</b> → <b>CCT</b>	Não houve	0	1
	557	<b>GGC</b> → <b>GGT</b>	Não houve	0	1
17-01	463	<b>CAA</b> → <b>TTA</b>	Q→ L	2	0
33-01	508	<b>AAA</b> → <b>CAA</b>	K→ Q	1	0
	556	<b>GTT</b> → <b>GCC</b>	V→ A	1	1
37-02	466	<b>GGT</b> → <b>AGT</b>	G→ S	1	0
BCoV-ENT	483	<b>CCC</b> → <b>TCC</b>	P→ S	1	0
	535	<b>ACT</b> → <b>ACC</b>	Não houve	0	1
LY-138	547	<b>TAC</b> → <b>TAT</b>	Não houve	0	1
BCQ-1523	479	<b>TGT</b> → <b>TGC</b>	Não houve	0	1
BCQ-20	470	<b>(G/C)AT</b> → <b>GCT</b>	(D, H) → A	1	0
BCQ-9	494	<b>TCT</b> → <b>TCA</b>	Não houve	0	1
	540	<b>ACA</b> → <b>ACT</b>	Não houve	0	1
	563	<b>TCG</b> → <b>TTG</b>	S→ L	1	0
Mebus	484	<b>ACA</b> → <b>TCA</b>	T→ S	1	0
BCQ-571	546	<b>CC(T/C)</b> → <b>TCC</b>	P→ S	1	0
BCV-F15	518	<b>GGT</b> → <b>GGC</b>	Não houve	0	1

Quadro 4 - Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos (em negrito) e de aminoácidos exclusivas a uma determinada amostra de coronavírus bovino em uma região de 330 aminoácidos/110 nucleotídeos do gene codificador da subunidade S1 do gene S dos coronavírus. As posições dos códon são dadas em relação ao gene S da amostra Mebus (U00735.2) - São Paulo - 2003

Posição	Códon	Aminoácido
465	GCA/ GTA	A/ V
470	GAT/ CAT/ GCT	D/ H/ A
499	AGT/ AAT	S/ N
501	TCT/ CTT/ CCT	S/ L/ P
501	TCT/ CTT/ CCT	S/ L/ P
509	AAT/ ACT	N/ T
510	ACT/ AGT	T/ S
511	GGT/ GGC	G
524	TGT/ TGC	C
528	GCC/ GCT	A
531	GAT/ AAT/ GGT	D/ N/ G
531	GAT/ AAT/ GGT	D/ N/ G
536	CCA/ CCC	P
543	GCT/ TCT	A/ S
546	CCT/ CCC/ TCC	P/ S
554	TAT/ TAC	Y

Quadro 5 - Códon e suas respectivas posições onde foram observadas substituições de nucleotídeos e de aminoácidos em mais de uma amostra em um mesmo sítio em uma região de 330 aminoácidos/110 nucleotídeos do gene codificador da subunidade S1 do gene S dos coronavírus. Posições representadas mais de uma vez indicam a ocorrência de mais de um sítio de substituição em um mesmo códon. As posições dos códon são dadas em relação ao gene S da amostra Mebus (U00735.2) - São Paulo - 2003

A árvore de máxima parcimônia apresentada como dendrograma na Figura 4 e como árvore radiada na Figura 5 demonstra que todas as amostras que apresentaram o *gap* de 18 nucleotídeos, inclusive a amostra padrão Kakegawa aqui seqüenciada, resultaram em um cluster politômico único suportado por um valor de “bootstrap“ de 62%, sendo que as amostras onde este *gap* não foi encontrado formaram um grupo à parte, de genealogia mais resolvida, evidenciando dois genótipos entre as amostras estudadas.

Utilizando uma seqüência de nucleotídeos da amostra B145 de bredavírus homóloga à região estudada como grupo externo para a construção de uma árvore enraizada (Figura 6), os dois genótipos de coronavírus bovino apresentam-se como grupos parafiléticos, sendo o *gap* demonstrado como um evento evolutivo único na genealogia apresentada.

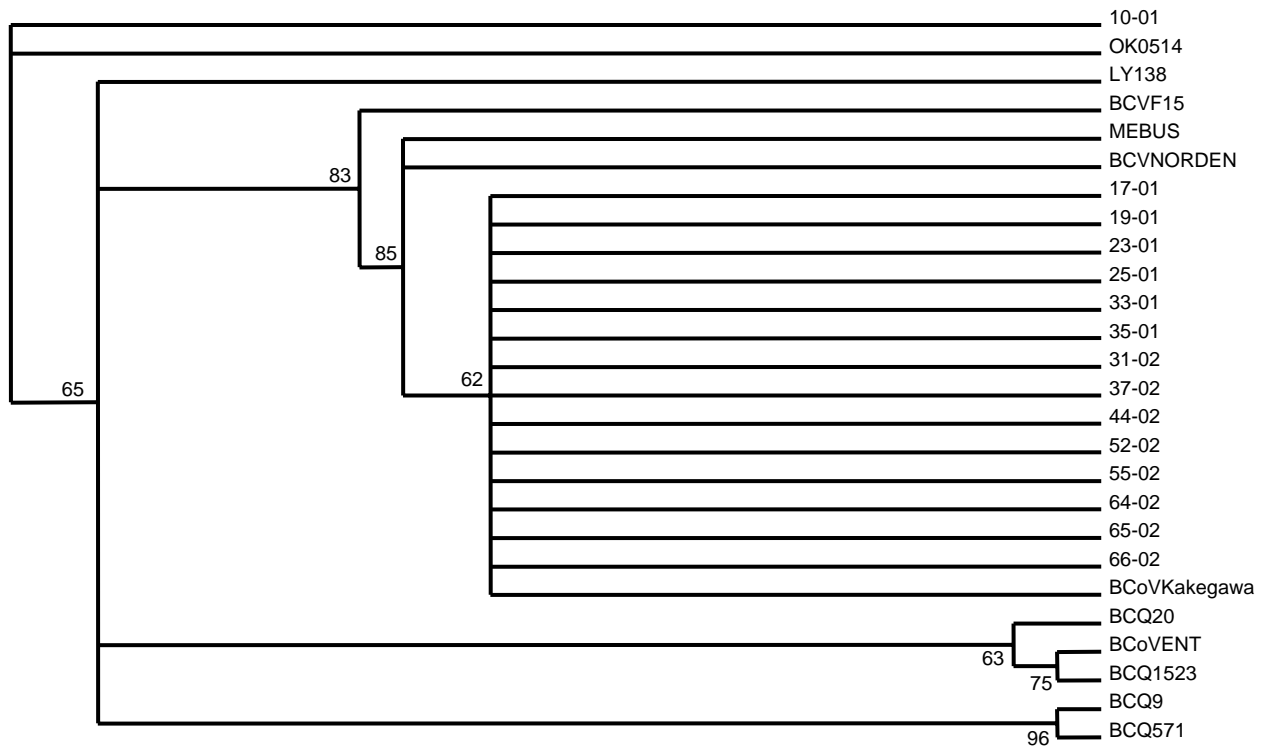


Figura 4 - Árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia realizada por busca heurística para a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S de coronavírus bovino. O número acima de cada ramo indica os valores de bootstrap suportando o mesmo - São Paulo - 2003

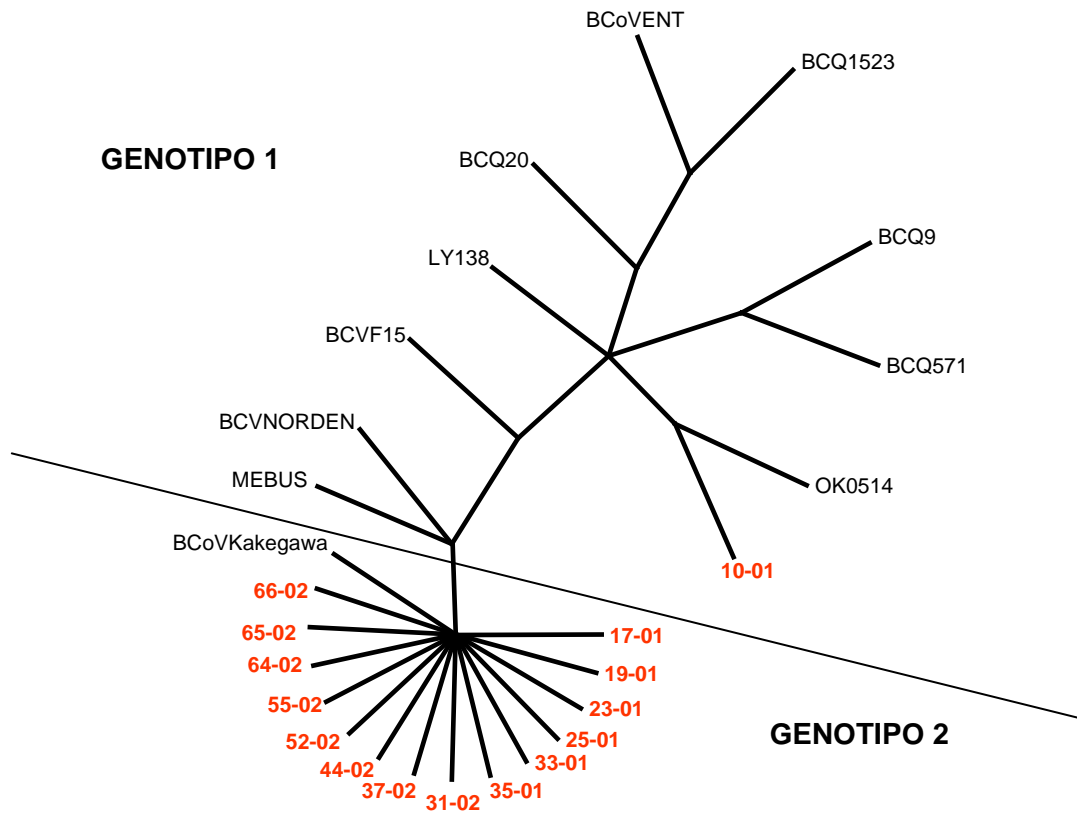


Figura 5 - Árvore consenso não-enraizada de máxima parcimônia realizada por busca heurística para a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S de coronavírus bovino destacando o agrupamento dos coronavírus bovinos em 2 genótipos. Amostras brasileiras, integrantes do presente estudo, encontram-se em vermelho - São Paulo - 2003

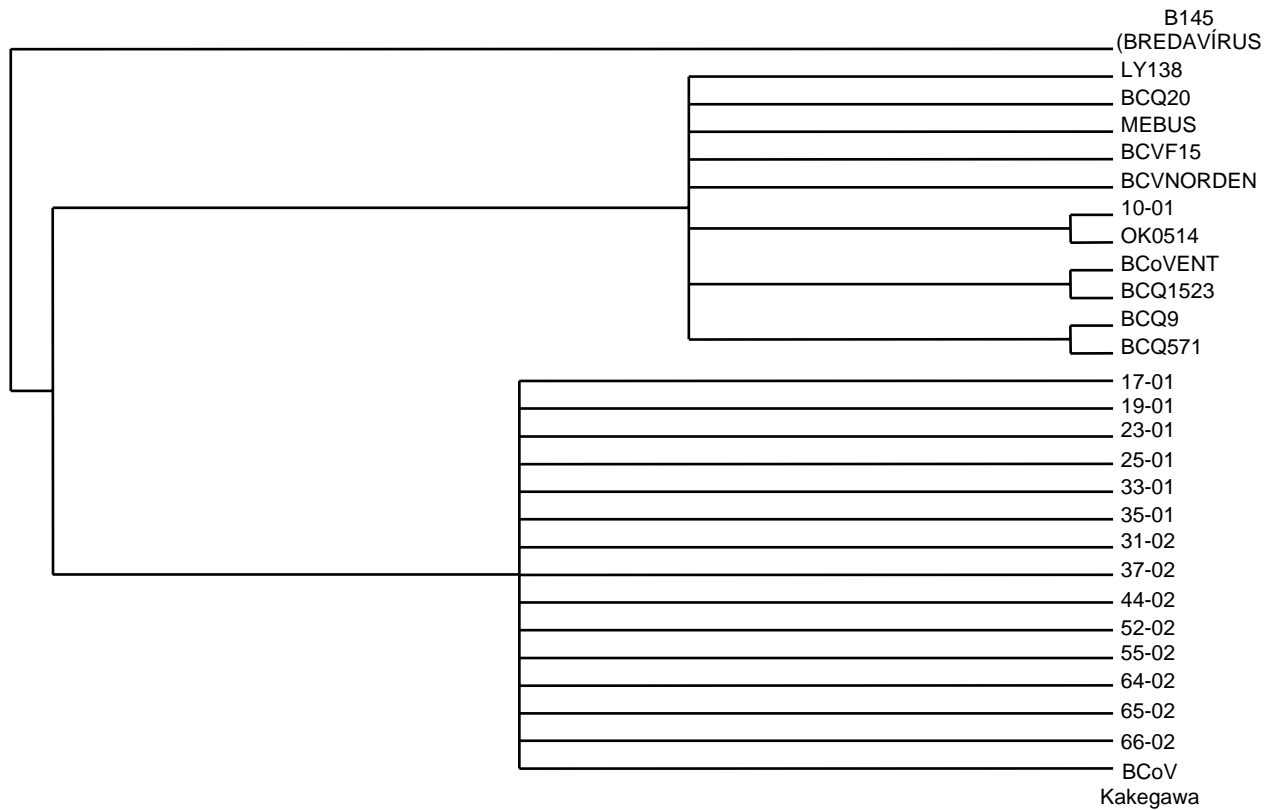


Figura 6 - Árvore consenso enraizada de máxima parcimônia realizada por busca heurística para a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S de coronavírus bovino, tendo como grupo externo a amostra B145 de bredavírus - São Paulo - 2003

O estudo da estrutura secundária das seqüências de aminoácidos de todas as 15 amostras brasileiras aqui estudadas e das amostras Mebus, Norden e BCQ-1523, estas três últimas elegidas por representarem o polimorfismo existente no último resíduo de aminoácido da região correspondente ao *gap* de 6 aminoácidos (Figura 3), demonstrou que tal *gap* ocorre dentro de uma região de alça da proteína S, sem previsão de fitas ou hélices (Figura 7).

**BCoV-Mebus**

----EEE----HHH-----EE-----EE-----EEEE-----

**BCoV-Norden**

----EEE----HHH-----EE-----EE-----EEEE-----

**BCQ 1523**

-----HHHH-----EE----E-----EE-----EEEE-----

**10-01**

-----HHHH-----EEE----EE-----EE-----EEEE-----

**17-01**

----EE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**19-01**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**23-01**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**25-01**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**31-02**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**33-01**

----EEE----HHH-----EE----EE-----EEE-\*\*\*\*\*-----E-----

**35-01**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**37-02**

----EEEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**44-02**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**52-02**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**55-02**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**64-02**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

**65-02**

----EE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----EE--

**66-02**

----EEE----HHH-----EE----E-----EEE-\*\*\*\*\*-----EEEE-----

Figura 7 - Predição da estrutura secundária de proteínas correspondente à região de alinhamento de nucleotídeos da figura 1. E= fita, H= hélice, - = alça e \* = *gap* - São Paulo - 2003

#### 4.5 COMPARAÇÃO ENTRE PCR PARA O GENE *POL* E HA/HI PARA A DETECÇÃO DE BCoV

O resultados da comparação entre as provas de HA/HI e PCR para o gene *pol* encontram-se sumarizados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 - Resultados de hemaglutinação/inibição da hemaglutinação e PCR para detecção de coronavírus bovino em relação aos indivíduos - São Paulo - 2003

PCR <i>pol</i>	HA/HI		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	16	35	51
NEGATIVO	56	96	152
TOTAL	72	131	203

Tabela 5 - Resultados de hemaglutinação/inibição da hemaglutinação e PCR para detecção de coronavírus bovino em relação às propriedades rurais - São Paulo - 2003

PCR <i>pol</i>	HA/HI		TOTAL
	POSITIVO	NEGATIVO	
POSITIVO	7	3	10
NEGATIVO	7	2	9
TOTAL	14	5	19

Aplicando-se os testes Kappa e J de Youden com nível de confiança de 99,5% a estes resultados com o software WinEpiscope 2.0, obtem-se a tabela 6:

Tabela 6 – Resultados dos testes kappa e de Youden para a comparação entre os testes de HA/HI e PCR para a detecção de coronavírus bovino em relação aos indivíduos e às propriedades rurais estudadas - São Paulo - 2003

	Resultado por indivíduos	Resultado por propriedades rurais
Kappa	-0,048	- 0,08
Teste J de Youden	-0,045	-0,1

#### 4.6 PESQUISA DE ROTAVÍRUS NAS AMOSTRAS FECAIS PELA TÉCNICA DE ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Das 203 amostras colhidas, 119 foram pesquisadas quanto à presença de rotavírus pela prova de eletroforese em gel de poliacrilamida, referentes a 14 propriedades rurais, resultando em uma frequência de 12,6% (15/119) em relação aos indivíduos e de 28,57 % (4/14) em relação às propriedades rurais, considerando-se como positiva a propriedade com ao menos 1 amostra positiva. Os resultados referentes a esta prova com relação à presença ou ausência de diarreia nas propriedades e nos animais encontram-se expostos nas tabelas 1 e 2. Propriedades rurais e animais dos quais não se tinham informações acerca da ocorrência de diarreia foram classificados como “diarreia desconhecida”.

#### 4.7 CO-INFECÇÕES POR BCoV E ROTAVÍRUS

Dentre as amostras e propriedades rurais onde houve pesquisa simultânea de rotavírus e BCoV nas amostras fecais, a prova de HA/HI associada à PAGE revelou co-infecção em 5 % (6/119) das amostras e 28,57% (4/14) das propriedades rurais. Substituindo-se HA/HI por PCR *pol*, a frequência de co-infecções por rotavírus e BCoV foi de 1,68 % (2/119) em relação às amostras e 28,57 % (4/14) em relação às propriedades. Não houve concordância em



nenhum dos casos de co-infecção entre as provas HA/HI e PCR *pol* em relação aos indivíduos, enquanto que tal concordância foi de 100% em relação às propriedades rurais.

## 5 DISCUSSÃO

A aplicação das técnicas de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação e PCR dirigida ao gene *pol* permitiu a identificação de coronavírus bovino entérico tanto entre amostras fecais colhidas de 22 bezerros e 7 propriedades rurais com ocorrência de diarreia quanto em amostras fecais colhidas de 93 bezerros e 5 propriedades que não se encaixaram na definição de caso. Estratificando os resultados segundo a prova aplicada, 8 animais com sintomas clínicos de diarreia e 6 propriedades onde a diarreia foi observada foram classificados como positivos pela prova de HA/HI, enquanto que a PCR classificou como positivos 2 animais e 4 propriedades com diarreia observada ou relatada. Quando aplicada a animais fora da definição de caso de diarreia e a propriedades classificadas como negativas por não apresentarem ao menos um animal dentro da definição, a prova de HA/HI foi positiva em 46 animais e 4 propriedades rurais, enquanto que a PCR demonstrou a presença de BCoV em 17 animais e 2 propriedades sem diarreia.

A aparente discrepância entre a proporção de animais positivos e de propriedades rurais positivas é explicada pelo fato de ter-se considerado como positiva ou como apresentando diarreia uma propriedade com ao menos um animal em uma destas duas condições, não sendo necessário que tal animal apresentasse as duas condições ao mesmo tempo, visto que animais sem diarreia também se apresentaram positivos por ao menos uma das duas provas e animais negativos foram também encontrados entre os diarreicos.

O encontro de BCoV em animais com diarreia sugere que este tenha alguma participação do desenvolvimento da mesma, visto que o coronavírus em bovinos afeta as células absortivas no intestino delgado e células da cripta no cólon (KAPIKIAN, 1994), levando à atrofia de vilosidades e conseqüente diarreia osmótica. Co-infecções, como, por exemplo, por rotavírus, agente encontrado em 6 animais e 3 propriedades rurais com relato de

diarréia, são fatores determinantes em processos patológicos entéricos e podem ter contribuído para os sinais observados em tais animais. Um dos mais recentes estudos acerca da ocorrência de coronavírus em bezerros realizado no Brasil (JEREZ et al., 2002) evidenciou, através da técnica de HA/HI, coronavírus em 39% (28/72) das amostras testadas, frequência próxima à frequência global encontrada neste estudo, através da mesma técnica, de 35,47% (72/203) (Tabela 1). A frequência de rotavírus encontrada (12,6%) também foi próxima ao referido estudo (14%) (Tabela 1).

A evidenciação de coronavírus em amostras provenientes de animais e de propriedades livres de diarréia é um fato de implicação direta para o aumento da morbidade de tais processos, visto que portadores, sejam eles sãos, resistentes, convalescentes ou em fase de incubação, podem servir como fonte de infecção para o aparecimento de uma determinada enfermidade quando os fatores de risco assim permitirem (THRUSFIELD, 1986). Uma explicação cabível para tal achado é que tais portadores tenham se apresentado sem sintomas de diarréia por se encontrarem ainda em período de incubação da infecção entérica por coronavírus, que pode variar de 18 a 96 horas (PENSAERT et al., 1994). Deve ser considerada aqui, também, a interferência do sub-diagnóstico clínico das diarréias, gerando a possibilidade da ocorrência de diarréia clínica em um animal sem que a mesma viesse a ser notada.

Dentre as amostras positivas para coronavírus pela prova de PCR, inclui-se uma referente a um animal de 6 meses de idade, discrepante da idade consenso para o achado de tal vírus, mas concordante com estudos mais recentes que demonstram que animais entre 6 a 9 meses de idade são susceptíveis à infecção e à diarréia por coronavírus bovino (KYOUNG-OH et al., 2000).

Para a comparação entre os resultados obtidos com a técnica de hemaglutinação/inibição da hemaglutinação e PCR, foi aplicado o teste Kappa, o qual expressa a proporção de

concordância entre dois testes; um valor kappa igual a 0 indica nenhuma concordância, entre 0,4 e 0,5 indica moderada concordância e kappa = 1 indica concordância perfeita (MARTIN ; MEEK; WILLEBERG, 1987). Como os valores de kappa para as comparações entre HA/HI e PCR *pol* ficaram abaixo de zero, tanto em relação aos indivíduos quanto em relação às propriedades (Tabela 6), não houve concordância entre tais provas.

O teste J de Youden combina informações sobre sensibilidade e especificidade em um único resultado, podendo assumir valores entre 1 e -1. Conforme aumentam a sensibilidade e a especificidade, aumenta também o valor de J. O valor de J é igual a 1 quando a soma da especificidade e da sensibilidade é igual a 200%, 0 quando a soma é 100% e -1 quando a soma é zero (MARTIN ; MEEK; WILLEBERG, 1987). Assim, como os valores de J para comparações entre HA/HI e PCR *pol* ficaram abaixo de 0, este teste corrobora a baixa concordância entre estas duas provas.

Nas tabelas 4 e 5, notam-se dois casos possíveis de discordância entre HA/HI e PCR *pol*. No primeiro caso, onde houve amostras positivas por HA/HI e negativas por PCR *pol*, hipóteses ligadas às amostras de fezes, às condições de reação e aos BCoV em si podem elucidar a discordância. O teste de HI, apesar de ser considerado como altamente específico, foi realizado com soro hiperimune policlonal, o que pode ter levado a resultados falso-positivos por reações inespecíficas entre o soro e outros elementos hemaglutinantes presentes nas amostras fecais, como, por exemplo, outros vírus. Ainda, variações na concentração da suspensão de hemácias de hamster usada para a hemaglutinação, preparada sem dosagem espectrofotométrica, podem ter contribuído para variações nas leituras dos títulos hemaglutinantes, inserindo aqui um viés para a geração de resultados falso-positivos.

No entanto, deve-se considerar que condições ligadas às amostras, como período de conservação, visto que algumas das amostras foram testadas em momentos diferentes para HA/HI e PCR, congelamentos e descongelamentos e a presença de RNAses e inibidores de

PCR nas fezes podem ter contribuído para os resultados falso-negativos de PCR em amostras que realmente fossem positivas por HA/HI (MEHRA, 1996; UWATOKO et. al., 1996). Deve-se levar em conta, também, a possibilidade de excesso de RNA nas reações de transcrição reversa e de DNA nas etapas de PCR, o que pode inibir as reações de transcrição e de polimerização na amostra (RASOOL; MONROE; GLASS, 2002).

Além disso, é possível que polimorfismos no gene *pol*, ainda que altamente conservado entre os coronavírus, tenham impedido a hibridação dos primers e a subsequente amplificação do segmento-alvo, gerando também resultados falso-negativos em amostras que realmente fossem positivas por HA/HI.

No segundo caso de discordância entre as duas provas, têm-se amostras negativas por HA/HI e positivas por PCR *pol*. Este tipo de discrepância é devido mais provavelmente ao baixo limiar de detecção da PCR, o qual permite detectar vírus em concentração baixa e fora do alcance de detecção do HA/HI. Assim, uma amostra que contivesse BCoV pode ter sido classificada como negativa em HA/HI por apresentar concentração de vírus insuficiente para a detecção por este método, mas suficiente para detecção por PCR.

A técnica de hemaglutinação/inibição de hemaglutinação permite o diagnóstico de coronavírus bovino por uma metodologia de baixo custo e de realização simples, mas requer a utilização de animais de laboratório, havendo, ainda, a possibilidade da geração de resultados falso-positivos quando se utiliza soro hiperimune policlonal.

A reação em cadeia pela polimerase apresenta-se como uma alternativa às reações sorológicas para o diagnóstico de coronavírus bovino, visto que permite um processamento rápido de um grande número de amostras e descarta a necessidade de se utilizarem animais de laboratório, eliminando variações inerentes à concentração de hemácias e à qualidade de soros hiperimunes. Ainda, por apresentar um mais baixo limiar de detecção (ERLICH, 1992), torna-

se uma alternativa interessante para estudos epidemiológicos em diarreias de bovinos jovens, uma vez avaliada a relação custo/ benefício.

Como apresentado no item 4.2, a reação de PCR proposta como método alternativo para o diagnóstico de infecções entéricas por BCoV foi capaz de detectar a amostra padrão Kakegawa diluído até 1:128 em uma suspensão fecal livre de coronavírus produzindo bandas evidentes para o fragmento previsto de 136pb sem bandas inespecíficas e amostras de campo de coronavírus de bezerros de idades e regiões variadas (Anexo A) com e sem diarreia.

Para uma comparação mais precisa entre estas duas técnicas, é necessário que uma terceira técnica tida como padrão-ouro venha a ser incluída, como, por exemplo, a imunoeletromicroscopia para coronavírus bovino (ATHANASIOUS et al., 1994), para que se possam obter sensibilidades e especificidades relativas e valores preditivos das mesmas frente a esta última.

Dentre as 51 amostras positivas para a PCR dirigida ao gene *pol*, 17 foram encontradas como positivas também para o gene codificador na região hipervariável da subunidade S1 da proteína S (Anexo A). A discrepância entre os dois testes pode ser primariamente atribuída às características dos dois pares de primers utilizados na segunda reação. Tais primers foram desenhados objetivando-se sua hibridação em regiões conservadas flanqueando a citada região hipervariável, mas, em algumas das amostras, polimorfismos inseridos dentro da região de hibridação dos primers podem ter impedido a amplificação, visto que regiões outras do gene S além das hipervariáveis são naturalmente sujeitas a variações, mesmo entre amostras isoladas de um único animal (CHOULJENKO et al., 2001; GALLAGHER; BUCHMEIER, 2001).

Deve ser levada em conta, também, a sensibilidade relativamente baixa encontrada para a PCR S1 (Item 4.3), a qual pode ter gerado resultados falso-negativos.

Ainda, como algumas amostras foram processadas em momentos diferentes e submetidas a extrações de RNA em separado para cada uma das reações de PCR, denaturação do RNA viral contida nas amostras pode ter ocorrido em função do período de armazenamento e discrepâncias entre extrações podem ter havido.

No entanto, esta reação, ao contrário da PCR *pol*, não tinha finalidade diagnóstica, mas sim de permitir a obtenção de fragmentos de DNA correspondentes ao gene codificador da região hipervariável de S1, tendo, nas condições descritas, produzido fragmentos seqüenciáveis de amostras representativas da distribuição dos indivíduos estudados (Anexo A).

Os produtos da reação de PCR S1 das 17 amostras positivas para a mesma foram submetidos ao seqüenciamento de DNA. Duas amostras das 17 nas quais se obteve amplificação do segmento de 488 pares de bases (amostras 12-01 e 15-01) não resultaram seqüências viáveis para a aplicação ao estudo genealógico, visto que não foi possível a obtenção de uma seqüência consenso entre as fitas senso e anti-senso de cada uma destas amostras em função da má qualidade de uma ou outra observada no cromatograma, mais provavelmente em função de falhas na reação de seqüenciamento, como, por exemplo, baixa concentração de DNA molde ou falhas na precipitação pós-reação.

A identidade média de nucleotídeos e a similaridade de aminoácidos entre as 15 seqüências de amostras brasileiras aqui pesquisadas, de 98,34% e 98%, respectivamente, foram superiores em relação às aquelas observadas entre amostras provenientes dos EUA, com identidade média de nucleotídeos de 97,26% e similaridade média de aminoácidos de 97% e amostras provenientes do Canadá, quando a identidade média de nucleotídeos foi de 97,35% e a similaridade média de aminoácidos de 96,67%. Entretanto, como demonstrado na tabela 3, a identidade mínima de nucleotídeos encontrada entre as 15 amostras brasileiras foi de 89,1%, inferior às identidades mínimas entre as amostras do EUA e entre aquelas provenientes do

Canadá. Esta discrepância é devida à baixa identidade entre a amostra 10-01 e as demais 14 amostras, sendo que a identidade mínima encontrada (89,1%) ocorreu entre as amostras 10-01 e 33-01, discrepância também notada na similaridade de aminoácidos, onde o valor mínimo encontrado deu-se entre a mesma amostra 10-01 e as amostras 17-01, 33-01, 37-02 e 65-02. Excetuando-se o observado em relação à amostra 10-01, estes resultados demonstram que, levando-se em conta a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S, as amostras de coronavírus que ocorrem no Brasil tendem a ser menos variáveis em nível nucleotídico e mais similares em aminoácidos do que aquelas que se apresentam em países como os EUA e o Canadá, dos quais há o maior número disponível de seqüências no GenBank.

A baixa identidade e a divergência entre as amostras seqüenciadas na presente pesquisa e as provenientes da América do Norte (Tabela 3) poderia ser sugerida como devida à distância geográfica entre as regiões estudadas, diferentes raças de bovinos e mesmo o sistema de manejo em questão, variáveis que somadas exerceriam pressão de seleção sobre a região hipervariável de S1 ao longo do tempo, o qual teve uma variação de até 38 anos como no caso da seqüência referente à amostra LY-138 (Quadro 3), sendo as outras seqüências obtidas de amostras das décadas de 70, 80 e 90 (CHOULJENKO et al., 2001; DEA; MICHAUD; MILANE, 1995; GÉLINAS et al., 2001).

Confirmando esta hipótese, pode-se notar (Tabela 3) que a média de identidades entre as amostras de coronavírus dos EUA e as do Canadá, países de localização geográfica próxima, são similares, o que levaria à circulação e disseminação de amostras de BCoV pouco divergentes na seqüência estudada entre animais destes dois países e à conseqüente elevada identidade entre tais amostras. É interessante observar que a elevada identidade esperada para outras regiões do gene S do BCoV, como, por exemplo, a região S1B, com identidade média de nucleotídeos de 97% (REKIK; DEA, 1994) ou todo o gene S, com identidade de



aproximadamente 98% (XUMING; KOUSOULAS; STORZ, 1991) para amostras provenientes também do Canadá e dos EUA, são próximas àquela entre as amostras norte americanas e canadenses incluídas neste estudo para a região do gene S considerada no presente estudo. Divergências dentro do gene S1 entre uma mesma espécie de coronavírus não são um fato incomum. Por exemplo, entre amostras diferentes do vírus da hepatite murina (MHV), a porção amino-terminal da subunidade S1 pode ter similaridade de aminoácidos entre 75 e 85% (SUZUKI; TAGUCHI, 1996). Ainda, entre algumas amostras de MHV e BCoV, espécies diferentes de coronavírus, o gene S1 pode ter até 81 % de identidade (BOIREAU; CRUCIERE; LAPORTE, 1990).

Entretanto, uma segunda, mas não menos importante hipótese que pode justificar uma maior identidade entre tais amostras do que entre as amostras de BCoV brasileiras aqui estudadas é que as amostras dos EUA, da França e do Canadá foram, ainda que em baixa passagem, adaptadas a culturas celulares, na sua maioria em células da linhagem HRT-18 (Quadro 3), enquanto que as seqüências aqui obtidas provêm diretamente do material clínico fecal; tal adaptação do coronavírus a culturas celulares pode, por seleção em condições similares, levar uma variante da proteína S a prevalecer sobre outras, criando um viés para a obtenção da seqüência “real” presente nas amostras clínicas originais (HAYS; MYINT, 1998). Este achado já foi descrito, por exemplo, para comparações entre coronavírus caninos de campo e amostras padrão deste vírus mantidas em cultura de células, onde a identidade de nucleotídeos máxima para o gene codificador da proteína S foi de 86,1% (NAYLOR et al., 2001).

Tal hipótese está em concordância com os mecanismos de evolução episódica propostos para os coronavírus (BARIC et al., 1997), segundo a qual a o relógio molecular é acelerado durante períodos de alterações ambientais, deletérias aos vírus progenitores, evoluindo a população em pequenos “saltos” num curto espaço de tempo no sentido de uma

população divergente da inicial, no caso, um baixo número de passagens em culturas celulares. Populações de coronavírus, um vírus RNA de tempo de geração tão baixo que permite que a replicação de RNA genômico seja detectada em menos de uma hora após a infecção em células (SUNGWHAN; MAEDA; MAKINO, 1998), grande tamanho populacional, taxa de mutação próxima de  $10^{-4}$  e taxa de recombinação de RNA de 20%, são sujeitas a uma elevada variabilidade genética, onde o alvo da seleção não é um genotipo único, mas uma população heterogênea de mutantes gerados por replicação errônea de um mutante mais freqüente, população de mutantes que permite o uso da denominação quasiespécies, a forma de apresentação esperada da população de coronavírus presente em uma amostra clínica (BARIC et al., 1997; ROTTIER, 1999; MOYA et al., 2000).

O alinhamento de nucleotídeos apresentado na Figura 2 traz, nas amostras de campo 17-01, 19-01, 23-01, 25-01, 33-01, 35-01, 31-02, 37-02, 44-02, 52-02, 55-02, 64-02, 65-02 e 66-02 e na amostra padrão Kakegawa, um *gap* de 18 nucleotídeos em comparação com as seqüências recuperadas do Genbank que vai da posição 1577 à 1594 do gene S, enquanto que na amostra 10-01, este *gap* é ocupado por 18 nucleotídeos com identidade de até 100% com as seqüências do Genbank apresentadas no alinhamento. Tal *gap* de nucleotídeos traduz-se em um *gap* de 6 aminoácidos das posições 526 a 531 da proteína S, com a perda de 1 cisteína e a substituição de uma cisteína da posição imediatamente após o *gap* por uma serina (Figura 3).

As árvores de máxima parcimônia apresentadas nas Figuras 4 e 5 demonstraram o agrupamento entre as amostras que possuem o *gap*, as quais formaram um cluster monofilético politômico, dentre as quais inclui-se a amostra Kakegawa, enquanto que as amostras provenientes do Canadá, EUA e França, juntamente com a amostra brasileira 10-01 aqui seqüenciada, nas quais não se observou o referido *gap*, resultaram em um segundo *cluster*, parafilético a este primeiro e de genealogia mais resolvida. A árvore enraizada apresentada na Figura 6 demonstra que este *gap* foi um evento evolutivo ocorrido em um

único momento na genealogia dos coronavírus, levando à geração de dois genótipos dentro desta espécie.

Observando-se a somatória destes resultados sob um modelo evolutivo de parcimônia, sugere-se que este *gap* seja mais provavelmente uma deleção, pois seria necessário um menor número de passos para criar esta deleção do que para levar a uma inserção de 18 nucleotídeos nas demais amostras, pois, segundo tal modelo, eventos independentes que geram condições finais iguais são de probabilidade minimizada, reduzindo o número de passos evolucionários extra, ou seja, o número de homoplasias, fenômenos que levam a similaridades em estados de caracteres através de, por exemplo, convergência, e não por homologia entre os grupos estudados, assumindo-se que os coronavírus bovinos tenham uma origem evolutiva comum (MIYAKI; RUSSO; PEREIRA, 2001; SWOFFORD et al., 1996). Deleções que levam ao estabelecimento de um modelo evolutivo para os coronavírus já foram utilizadas, por exemplo, para investigar a existência e a origem de mais de um sorotipo do vírus da peritonite infecciosa felina (VENNEMA, 1999).

Nas árvores apresentadas nas figuras 4, 5 e 6, há uma tendência das amostras de campo em apresentarem a deleção e das amostras isoladas em cultivos celulares não apresentarem a mesma. Entretanto, três achados são discrepantes da aparente relação entre a existência de deleção e a origem não derivada de cultivo celular de uma dada amostra de BCoV: primeiramente, a amostra Kakegawa, uma amostra de BCoV detectada no Japão em 1980 em uma vaca com diarreia (AKASHI et al., 1980) e mantida em células da linhagem HmLu-1, a mesma linhagem celular a partir das quais era mantida tal amostra cujo seqüenciamento foi pela primeira vez realizado no presente estudo, apresentou a deleção de 18 nucleotídeos/ 6 aminoácidos na mesma posição referida para as 14 amostras brasileiras. Além disso, as amostras LY-138, mantida por passagem oral em bezerros e a amostra 10-01, esta integrante da presente pesquisa, foram seqüenciadas diretamente de material fecal, sem a

passagem por cultivos celulares e não apresentaram a deleção, fazendo com que tanto amostras de BCoV derivadas de cultivos celulares quanto aquelas derivadas diretamente de material clínico fecal tenham representantes tanto no genótipo 1 quanto no genótipo 2.

Assim, sugere-se que a deleção que originou os dois genótipos de coronavírus bovino aqui descritos tenha ocorrido em um momento anterior à descrição do primeiro coronavírus bovino e ao primeiro isolamento do mesmo em cultivos celulares, tendo os dois genótipos se disseminado pelos diversos países após este evento evolutivo; como a amostragem utilizada não é estatisticamente representativa da população-alvo do estudo, não se pode inferir se o genótipo 2 é realmente o mais prevalente no rebanho bovino leiteiro no Brasil ou se este fato aqui observado é devido a um viés de amostragem.

A implicação biológica de deleções na proteína S podem ser uma mais lenta atividade fusogênica (KRUEGER et al., 2001), perda do sítio de clivagem entre as subunidades S1 e S2 (YAMADA et al., 1997) e alterações no tropismo por tecidos (LEPARC-GOFFART et al., 1997). Entretanto, a deleção de 6 aminoácidos aqui descrita ocorre dentro de uma região hipervariável da subunidade S1 e dentro de parte do domínio II da mesma, este responsável pela geração dos epítomos conformacionais A e B desta subunidade, podendo levar à perda da reatividade cruzada entre os dois genótipos em reações de soroneutralização (DONGWAN; DEREGT, 2001). Assim sendo, ainda que a deleção não tenha levado a alterações profundas de estrutura secundária, como demonstrado na Figura 7, é possível que a alça deletada da subunidade S1 tenha levado tanto à perda dos epítomos conformacionais quanto à emergência de novos epítomos por alterações na estrutura terciária da proteína ou pela aproximação dos epítomos já existentes.

Além disso, uma vez que o ectodomínio S1 é envolvido na ligação da proteína S a receptores celulares, mutações na mesma podem ser um indício de uma relação parasita-hospedeiro diferente. Por exemplo, para o coronavírus humano HCoV-229E, a região entre os

aminoácidos 417 a 547 da proteína S, a mesma onde foi detectada a deleção nas amostras de BCoV no presente estudo, foi demonstrada como essencial à ligação aos receptores específicos para esta espécie viral, a aminopeptidase humana (BONAVIA et al.; 2003). A extensão de deleções na região hipervariável da subunidade S1 pode, também, levar a fenótipos que diferem entre si quanto à ligação a receptores celulares, clivagem entre as subunidades S1 e S2, alterações conformacionais na proteína S e diferentes tropismos e padrões de doença causada por coronavírus (ZELUS et al., 2003).

A capacidade de escapar ao sistema imune do hospedeiro é também uma condição que pode ser conferida após deleções de epítomos do ectodomínio S1, tornando as variantes de coronavírus que apresentam tais deleções capazes de escapar à ação de linfócitos T citotóxicos e permanecer replicando (BERGMANN et al., 1996; CASTRO; PERLMAN, 1995; PEWE et al., 1996). A ocorrência de RNAs virais com deleções na seqüência do gene S, como , por exemplo, deleções entre os nucleotídeos 1200 a 1800 na terminação 5' no gene S de alguns isolados de coronavírus da hepatite murina (MHV), na mesma região onde se detectou a deleção de 18 nucleotídeos no presente estudo, contribui para que populações de coronavírus ocorram sob a forma de quasiespécies (ROWE et al., 1997)

A amostra 10-01, pertencente ao genotipo 1, e as amostras 17-01, 19-01, 23-01, 25-01, 52-02, 55-02, 64-02, 65-02 e 66-01, pertencentes ao genotipo 2, chegaram ao laboratório sem informações acerca da condição clínica dos bezerros dos quais foram colhidas; as amostras 33-01, 35-01, 31-02, 37-02 e 44-02, alocadas no genotipo 2, foram colhidas de bezerros aparentemente sem diarreia no momento da colheita (Anexo A). Em função desta perda de informação clínica, não se podem levantar hipóteses acerca da variação da patogenia ou da virulência entre as 15 amostras aqui estudadas, mas, considerando-se a posição das seqüências recuperadas do Genbank nas árvores genealógicas (Figuras 4, 5 e 6), todas obtidas de animais com diarreia, os dois genotipos podem levar ao surgimento de enterite e diarreia. Chama a

atenção o fato de que a amostra Kakegawa foi agrupada no genotipo 2 entre algumas das amostras brasileiras colhidas de bezerros, pois esta amostra origina-se de uma vaca com diarreia detectada no Japão (AKASHI et al., 1980), o que é concordante com o conhecimento de que é alta a identidade entre amostras de coronavírus bovino causadoras da diarreia neonatal e da disenteria em vacas adultas (DEA; MICHAUD; MILANE, 1995).

Entender a distribuição das mutações de aminoácidos em proteínas virais antigenicamente tão relevantes como a proteína de espícula dos coronavírus é um procedimento importante para a previsão de variações antigênicas, o que vem sendo de extrema aplicação no caso do coronavírus causador da SARS, cuja maioria das mutações concentra-se na subunidade S1, apresentando-se estas mutações como “assinaturas” que permitem rastrear as fontes de infecção (SPIGA et al.; 2003; YIJUN et al., 2003).

Mutações em nucleotídeos podem causar troca do aminoácido codificado pelo códon onde se deu a mutação ou resultar em códons de parada (mutações não sinônimas) ou não levar a alterações em aminoácidos (mutações sinônimas) (LI, 1997). Dos 37 sítios da região de alinhamento onde se observaram substituições de nucleotídeos, 21 foram exclusivos de uma determinada amostra, sendo que 6 amostras apresentaram um número de substituições não sinônimas superior ao de sinônimas (Quadro 4): as amostras integrantes da presente pesquisa 17-01, 37-02 e 33-01 e as amostras de referência BCQ-20, MEBUS e BCQ-571. Os outros 16 sítios com substituição de nucleotídeos, dos quais 11 apresentaram substituição de aminoácido (Quadro 5), são compartilhados por duas ou mais amostras, não sendo substituições únicas e, portanto, podem representar regiões consensuais ou homólogas entre as respectivas amostras sem que as substituições impliquem necessariamente em uma condição derivada.

Assim sendo, nas seqüências nas quais se observou um número de substituições não sinônimas superior ao de substituições sinônimas, considerando-se apenas as mutações

pontuais exclusivas a determinadas amostras (Quadro 4) e não as ocorridas em sítios variáveis compartilhados por duas ou mais amostras, tem-se uma indicação de seleção positiva, onde as substituições de aminoácidos foram vantajosas para a determinada amostra de BCoV nas quais e quando as mesmas ocorreram, o que pode resultar do fato de que, sob seleção positiva, a taxa de fixação de substituições não sinônimas é superior à taxa de substituição de nucleotídeos (CALCAGNOTTO, 2001; PAGE; HOLMES, 1998).

No Brasil, apesar de existirem relatos da ocorrência de coronavírus bovino em bezerros, outros estudos focados na diversidade molecular deste vírus não existem até o momento, não havendo dados para a comparação com os resultados aqui apresentados e, mesmo considerando-se outros países, é pouca a diversidade de seqüências de nucleotídeos do gene codificador da proteína S disponíveis para comparação nas bases de dados internacionais. A disponibilidade de um maior número de seqüências derivadas de amostras de BCoV encontradas em outras regiões geográficas no Brasil é necessária para que se verifique se os achados se mantêm ou se são exclusivos das regiões aqui estudadas.

Como já discutido, a proteína S é o mais importante fator de virulência dos coronavírus, envolvido diretamente no desenvolvimento da patogenicidade dos mesmos e é a de maior antigenicidade e imunogenicidade. Assim, espera-se que variações no gene codificador da proteína S e, principalmente, em regiões hipervariáveis, como a estudada na presente pesquisa, possam servir como marcadores moleculares para o entendimento da epidemiologia das coronaviroses em bovinos e para o desenvolvimento de métodos diagnósticos e de caracterização molecular entre amostras de BCoV, bem como para a predição da eficiência de imunógenos contra as variantes virais em circulação no Brasil. Pesquisas voltadas às características de patogenicidade e à virulência comparada entre os dois genótipos são também um campo aberto por estes resultados, bem como a investigação de outras regiões do

genoma dos coronavírus bovinos, como, por exemplo, a região codificadora da subunidade S2, envolvida na fusão de membranas celulares durante a infecção viral.

Ainda, tendo-se disponível um método de diagnóstico alternativo como a PCR e dados comparativos entre a mesma e a técnica clássica de hemaglutinação/ inibição da hemaglutinação, criam-se subsídios para pesquisas continuadas em relação à epidemiologia das diarreias em bovinos.



## 6 CONCLUSÕES

- A técnica de hemaglutinação confirmada pela técnica de inibição da hemaglutinação permitiu detectar a ocorrência de coronavírus bovino (BCoV) em amostras de fezes de 72 bezerros sintomáticos e assintomáticos para diarreia de 203 testados.
- Ficou padronizada uma técnica de RT-PCR dirigida ao gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente (gene *pol*) útil para a detecção do BCoV em amostras de fezes de bezerros, quer estes apresentem ou não sintomas de diarreia.
- A comparação entre os resultados obtidos com a técnica de RT-PCR padronizada com a prova de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação na detecção de coronavírus bovino (BCoV) em amostras de fezes de bezerros demonstrou haver baixa concordância entre as técnicas.
- A identidade média de nucleotídeos para a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S dos BCoV a partir de seqüenciamento do DNA correspondente à mesma entre as amostras brasileiras de campo estudadas é de 98,34%.
- Fica proposta uma genealogia para os coronavírus bovinos com base na seqüência de nucleotídeos da região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S segundo a qual há dois genótipos distintos dentro desta espécie viral, sendo os dois genótipos encontrados entre amostras brasileiras.

**REFERÊNCIAS <sup>1</sup>**

- ABRAHAM, S.; KIENZLE, T. E.; LAPPS, W.; BRIAN, D. A. Deduced sequence of the bovine coronavirus spike protein and identification of the internal proteolytic cleavage site. **Virology**, v. 176, p. 296-301, 1990.
- AKASHI H.; INABA, Y.; MIURA, Y.; TOKUHISHA, S.; SATO, K.; SATODA, K. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. **Veterinary Microbiology**, v. 5, p. 265-276, 1980.
- ATHANASSIOUS, R.; MARSOLAIS, G.; ASSAF, R.; DEA, S.; DESCÔTEAUX, J. P.; DULUDE, S.; MONTPETIT, C. Detection of bovine coronavirus and type A rotavirus in neonatal calf diarrhea and winter dysentery of cattle in Quebec: evaluation of three diagnostic methods. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 163-169, 1994.
- BARIC, R. S.; YOUNT, B.; HENSLEY, L.; PEEL, S. A. ; CHEN, W. Episodic evolution mediates interspecies transfer of a murine coronavirus. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 1946-1955, 1997.
- BEAUDETTE, F. R.; HUDSON, C. B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 90, p. 51-60, 1937.
- BERGMANN, C. C.; YAO, Q.; LIN, M.; STOHLMAN, S. A. . The JHM strain of mouse hepatitis virus induces a spike protein-specific Db-restricted cytotoxic T cell response. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 315-325, 1996.
- BENFIELD, D. A.; SAIF, L. J. Cell culture propagation of a bovine coronavirus isolated from cows with winter dysentery. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1454-1457, 1990.
- BOIREAU, P.; CRUCIERE, C.; LAPORTE, J. Nucleotide sequence of the glycoprotein S gene of bovine enteric coronavirus and comparison with the S proteins of two mouse hepatitis virus strains. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 487-492, 1990.
- BONAVIA, A.; ZELUS, B. D.; WENTWORTH, D. E.; TALBOT, P. J.; HOLMES, K. V.; Identification of a receptor-binding domain of the spike glycoprotein of human coronavirus HCoV-229E. **Journal of Virology**, v. 77, n. 4, p. 2530-2538, 2003.

<sup>1</sup> De acordo com Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses. São Paulo, FMVZ-USP, 2003

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

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.

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

BROWN, A. J. L. Methods of evolutionary analysis of viral sequences. In: MORSE, S. S. **The evolutionary biology of viruses**. New York: Raven Press, 1994. p. 75-84.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. São Paulo: Holos, 2001. p. 51-63.

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

CASTRO, R. F.; PERLMAN, S. CD8<sup>+</sup> T cells epitopes within the surface glycoprotein of a neurotropic coronavirus and correlation with pathogenicity. **Journal of Virology**, v. 69, p. 8127-8131, 1995.

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

CHOULJENKO, V. N.; LIN, X. Q.; STORZ, J.; KOUSOULAS, K. G.; GORBALENYA, A. E. Comparison of genomic and predicted aminoacids sequences of respiratory and enteric bovine coronaviruses isolated from the same animal with fatal shipping pneumonia. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 2927-2933, 2001.

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

COLLINS, A. R.; KNOBLER, R. L.; POWELL, H.; BUCHMEIER, M. J. Monoclonal antibodies to murine hepatitis virus-4 (strain JHM) define the viral glycoprotein responsible for cell attachment and cell-cell fusion. **Virology**, v. 119, p. 358-371, 1982.

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

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

DEA, S.; MICHAUD, L.; MILANE, G. Comparison of bovine coronavirus isolates associated with neonatal calf diarrhoea and winter dysentery in adult dairy cattle in Québec. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 1263-1270, 1995.

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

DONGWAN, Y; DEREGT, D. A single aminoacid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 297-302, 2001.

DOYLE, L. P.; HUTCHINGS, L. M. A transmissible gastroenteritis in pigs. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 108, p. 257-259, 1946.

EL-GHORR, A. A.; SNODGRASS, D. R.; SCOTT, F. M. M.; CAMPBELL, I. A serological comparison of bovine coronavirus strains. **Archives of Virology**, v. 104, p. 241-248, 1989.

ERLICH, H. A. **PCR technology**. New York: W. H. Freeman and Company, 1992. p. 1-5.

FISCHER, F. ; DING, P. ; HINGLEY, S. T. ; WEISS, S. R. ; MASTERS, P. S. The internal open reading frame within the nucleocapsid gene of mouse hepatitis virus encodes a structural protein that is not essential for viral replication. **Journal of Virology**, v. 71, n. 2, p.996-1003, 1997.

FORGHANI, B.; ERDMAN, D. D. Amplification and detection of viral nucleic acids. In: SCHMIDT, J. N.; EMMONS, R. W. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. Washington, DC : American Public Health Association, 1994. p. 97-120.

GALLAGHER, T. M.; BUCHMEIER, M. J. Coronavirus spike proteins in viral entry and pathogenesis. **Virology**, v. 279, p. 371-374, 2001.

GAMBLE, D. A.; LOBBIANI, A.; GRAMEGNA, M.; MOORE, L. E.; COLUCCI, G. Development of a nested PCR assay for detection of feline infectious peritonitis virus in clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 673-675, 1997.

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

GERNA, G.; CEREDA, P. M.; REVELLO, M. G.; CATTANEO, E.; BATTAGLIA, M.; GERNA, M. T. Antigenic and biological relationships between human coronavirus OC-43 and neonatal calf diarrhoea coronavirus. **Journal of General Virology**, v. 54, p. 91-102, 1981.

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.

GUNN-MOORE, D. A.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; HARBOUR, D. A. Detection of feline coronaviruses by culture and reverse transcriptase-polymerase chain reaction of blood samples from healthy cats and cats with clinical feline infectious peritonitis. **Veterinary Microbiology**, v. 62, p. 193-205, 1998.

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

HAYS, J. P.; MYINT, S. H. PCR sequencing of the spike genes of geographically and chronologically distinct human coronaviruses 229E. **Journal of Virological Methods**, v. 75, p. 179-93, 1998.

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

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

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

HILLIS, D. M.; MABLE, B. K.; MORITZ, C. Applications of molecular systematics: the state of the field and a look to the future. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular systematics**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p. 515-543.

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

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

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.

JEREZ, J. A. Diarréias virais dos bezerros: rotavírus e coronavírus. **Biológico**, v. 59, n. 2, p. 33-37, 1997.

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

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

KAPIL, S.; RICHARDSON, K. L. ; MAAG, T. R.; GOYAL, S. M. Characterization of bovine coronavirus isolates from eight different states in the USA. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 221-230, 1999.

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

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

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

KRUEGER, D. K.; KELLY, S. M.; LEWICKI, D. N.; RUFFOLO, R.; GALLAGHER, T. M. Variations in disparate regions of the murine coronavirus spike protein impact the initiation of membrane fusion. **Journal of Virology**, v. 75, n. 6, p. 2792-2802, 2001.

KSIAZEK, T. G.; ERDMAN, D.; GOLDSMITH, C. S.; ZAKI, S. R.; PERET, T.; EMERY, S.; SUXIANG, T.; URBANI, C.; COMER, J. A.; LIM, W.; ROLLIN, P. E.; DOWELL, S. F.; AI-EE, L.; HUMPHREY, C. D.; WUN-JU, S.; GUARNER, J.; PADDOCK, C. D.; ROTA, P.; FIELDS, B.; DERISI, J.; JYH-YUAN, Y.; COX, N.; HUGHES, J. M.; LEDUC, J. W.; BELLINI, W. J.; ANDERSON, L. J. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 20, p. 1953-1966, 2003.

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

KUNITA, S.; ZHANG, L.; HOMBERGER, F. R.; Molecular characterization of the S proteins of two enterotropic murine coronavirus strains. **Virus Research**, v. 35, p. 277-289, 1995.

KYOUNG-OH, C.; HALBUR, P. G.; BRUNA, J. D.; SORDEN, S. D.; KYOUNG-JIN, Y.; JANKE, B. H.; KYEONG-OK, C.; SAIF, L. J. Detection and isolation of coronavirus from feces of three herds of feedlot cattle during outbreaks of winter dysentery-like diseases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 8, p. 1191-1194, 2000.

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

LAUDE, H.; VAN REETH, K.; PENSAERT, M. Porcine respiratory coronavirus: molecular features and virus-host interactions. **Veterinary Research**, v. 24, p. 125-150, 1993.

LEPARC-GOFFART, I.; HINGLEY, S. T.; MING, M. C.; XINHE, J.; LAVI, E.; WEISS, S. R. Altered pathogenesis of a mutant of the murine coronavirus MHV-A59 is associated with a Q159L amino acid substitution in the spike protein. **Virology**, v. 239, p. 1-10, 1997.

LI, W. **Molecular evolution**. Sunderland: Sinauer Associates Publishers, 1997. 487 p.

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

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

MARTIN, S. W.; MEEK, A. H.; WILLEBERG, P. **Veterinary epidemiology**. Ames: Iowa State University Press, 1987. p. 73-75.

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

MEBUS, C. A.; WHITE, R. G.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Neonatal calf diarrhea: results of a field trial using a reo-like virus vaccine. **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**, v. 67, p. 173-178, 1972.

MEBUS, C. A.; STAIR, E. L.; RHODES, M. B.; TWIEHAUS, M. J. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation, and characteristics of a coronavirus-like agent. **American Journal of Veterinary Research**, v. 34, p. 145-150, 1973.

MEHRA, M. RNA isolation from cells and tissues. In: KRIEG, P. A. **A laboratory guide to RNA isolation, analysis and synthesis**. New York: Wiley-Liss, 1996. p. 1-20.

MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. A. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método de máxima parcimônia. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. São Paulo: Holos, 2001. p. 97-107.



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

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

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

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

PEWE, L.; WU, G. F.; BARNETT, E. M.; CASTRO, R. F.; PERLMAN, S. Cytotoxic T cell-resistant variants are selected in a virus-induced demyelinating disease. **Immunity**, v. 5, p. 253-262, 1996.

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, p. 11-15, 1999.

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

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

REKIK, M. R.; DEA, S. Comparative sequence analysis of a polymorphic region of the spike glycoprotein S1 subunit of enteric bovine coronavirus isolates. **Archives of Virology**, v. 135, p. 319-31; 1994.

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

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

ROTTIER, P. J. M. The molecular dynamics of feline coronaviruses. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 117-25, 1999.

ROWE, C. L.; FLEMING, J. O.; NATHAN, M. J.; SGRO, J.; PALMENBERG, A. C.; BAKER, S. C. Generation of coronavirus spike deletion variants by high-frequency recombination at regions of predicted RNA secondary structure. **Journal of Virology**, v. 71, n. 8, p. 6183-6190, 1997.

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

SAIF, L. J. Coronavirus immunogens. **Veterinary Microbiology**, v. 37, p. 285-297, 1993.

SÁNCHEZ, C. M.; JIMÉNEZ, G.; LAVIADA, M. D.; CORREA, I.; SUNÉ, C.; MARÍA, J. B.; GEBAUER, F.; SMERDOU, C.; CALLEBAUT, P.; ESCRIBANO, J. M., ENJUANES, L. Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. **Virology**, v. 174, p. 410-417, 1990.

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

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

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

SENANAYAKE, S. D.; BRIAN, D. A. Bovine coronavirus I protein synthesis follows ribosomal scanning on the bicistronic N mRNA. **Virus Research**, v. 48, p. 101-105, 1997.

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

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

SPIGA, O.; BERNINI, A.; CIUTTI, A.; CHIPELLINI, S.; MENCIASSI, N.; FINETTI, F. CAUSARONO, V.; ANSELMINI, F.; PRISCHI, F.; NICCOLAI, N. Molecular modelling of S1 and S2 subunits of SARS coronavirus spike glycoprotein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 310, p. 78-83, 2003.

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

STORZ, J.; XIAOQING, L.; PURDY, C. W.; CHOULJENKO, V. N.; KOUSOULAS, K. G.; ENRIGHT, F. M.; GILMORE, W. C.; BRIGGS, R. E.; LOAN, R. W. Coronavirus and *Pasteurella* infections in bovine shipping fever pneumonia and Evan's criteria for causation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3291-3298, 2000.

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

SUZUKI, H.; TAGUCHI, F. Analysis of the receptor-binding site of murine coronavirus spike protein. **Journal of Virology**, v. 70, n. 4, p. 2632-2636, 1996.

SWOFFORD, D. L.; OLSEN, G. J.; WADDELL, P. J.; HILLIS, D. M. Phylogenetic inference. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. **Molecular systematics**. 2. ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. p. 407-514.

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.

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

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. London: Butterworths, 1986. 280 p.

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

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

TSUNEMITSU, H.; EL-KANAWATI, Z. R. ; SMITH, D. R. ; REED, H. H. ; SAIF, L. J. Isolation of coronaviruses antigenically indistinguishable from bovine coronavirus from wild ruminants with diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 12, p.3264-3269, 1995.

UWATOKO, K.; SUNAIRI, M.; YAMAMOTO, A.; NAKAJIMA, M.; YAMAURA, K. Rapid and efficient method to eliminate substances inhibitory to the polymerase chain reaction from animal fecal samples. **Veterinary Microbiology**, v. 52, p. 73-79, 1996.

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

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; PRINGLE, C. R.; WICKNER, R. B. **Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses**. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press, 2000. 1167 p.

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

VENNEMA, H. Genetic drift and genetic shift during feline coronavirus evolution. **Veterinary Microbiology**, v. 69, p. 134-141, 1999.

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

WESLEY, R. D. The S gene of canine coronavirus strain UCD-1, is more closely related to the S gene of transmissible gastroenteritis virus than to that of feline infectious peritonitis virus. **Virus Research**, v. 61, p. 145-152, 1999.

WHELAN, S.; LIÒ, P.; GOLDMAN, N. Molecular phylogenetics: state-of-the-art methods for looking into the past. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 5, p. 262-272, 2001.

WHITE, R. G., MEBUS, C. A.; TWIEHAUS, M. J. Incidence of herds infected with a Neonatal Calf Diarrhea Virus (NCDV). **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**, v. 65, p. 487-490, 1970.

XIAOQING, L.; O'REILLY, K. L.; BURRELL, M. L.; STORZ, J. Infectivity-neutralizing and hemagglutinin-inhibiting antibody responses to respiratory coronavirus infections of cattle in pathogenesis of shipping fever pneumonia. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 357-362, 2001.

XUMING, Z.; KOUSOULAS, K. G.; STORZ, J. Comparison of nucleotide and deduced amino acids sequences of the S genes specified by virulent and avirulent strains of bovine coronaviruses. **Virology**, v. 183, p. 397-404, 1991.

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

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

YIJUN, R.; CHIA, L. W.; LING, A. E.; VEGA, V. B.; THOREAU, H.; SE, T. S. Y.; JER-MING, C.; NG, P.; KUO, P. C.; LANDRI, L.; ZHANG, T.; CHAN, K. P.; EAN, L. O. L.; NG, M. L.; SIN, L. Y.; NG, L. F. P.; CHEE, R. E.; STANTON, L. W.; LONG, P. M.; LIU, E. T. Comparative full-length genome sequence analysis of 14 SARS coronavirus isolates and common mutations associated with putative origins of infection. **The Lancet**, v. 361, p. 1779-1785, 2003.

ZELUS, B. D.; SCHICKLI, J. H.; BLAU, D. M.; WEISS, S. R.; HOLMES, K. V. Conformational changes in the spike glycoprotein of murine coronavirus are induced at 37 °C either by soluble murine CECAM1 receptors or by pH 8. **Journal of Virology**, v. 77, n. 2, p. 830-840, 2003.

ZHANG, Z.; ANDREWS, G. A.; CHARD-BERGSTROM, C.; MINOCHA, H. C.; KAPIL, S. Application of immunohistochemistry and in situ hybridization for detection of bovine coronavirus in paraffin-embedded, formalin-fixed intestines. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2964-2965, 1997.

## ANEXOS

## ANEXO A

Resultados dos testes de hemaglutinação/inibição da hemaglutinação (HA/HI) e PCR para o gene *pol* (PCR *pol*) e para a região hipervariável do gene codificador da subunidade S1 da proteína S (PCR S1) para pesquisa de coronavírus bovino e PAGE para rotavírus (RV) das amostras fecais segundo Municípios e propriedades e ocorrência de diarreia. O número após a barra na numeração referente a cada amostra indica o ano de colheita da mesma (00 = 2000, 01 = 2001; 02 = 2002).

Nº	AMOSTRA	DIARRÉIA	HA/HI	PCR <i>pol</i>	PCR S1	RV	Município/ propriedade
1	04/00	A	N	N	---	N	Descalvado 1/SP
2	06/00	A	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
3	07/00	A	N	P	N	N	Descalvado 1/SP
4	08/00	P	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
5	09/00	A	N	N	---	P	Descalvado 1/SP
6	10/00	A	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
7	12/00	A	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
8	13/00	A	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
9	14/00	P	N	N	---	N	Descalvado 1/SP
10	15/00	A	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
11	16/00	P	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
12	18/00	A	P	N	---	P	Descalvado 1/SP
13	19/00	A	P	P	N	N	Descalvado 1/SP
14	21/00	A	N	N	---	N	Descalvado 1/SP
15	22/00	A	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
16	23/00	A	P	N	---	N	Descalvado 1/SP
17	25/00	A	N	N	---	N	Descalvado 1/SP
18	26/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
19	28/00	A	N	N	---	N	Porto Feliz/SP
20	29/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
21	30/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
22	31/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
23	32/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
24	33/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
25	35/00	A	N	N	---	N	Porto Feliz/SP
26	36/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
27	37/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
28	38/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
29	39/00	A	P	N	---	N	Porto Feliz/SP
30	41/00	P	P	N	---	P	Assis/SP
31	42/00	P	P	N	---	N	Assis/SP
32	43/00	P	P	N	---	P	Assis/SP
33	44/00	P	N	P	N	N	Assis/SP

34	45/00	P	N	N	---	P	Assis/SP
35	46/00	P	P	N	---	P	Assis/SP
36	47/00	P	P	N	---	P	Assis/SP
37	48/00	P	N	N	---	N	Assis/SP
38	49/00	A	P	N	---	N	Assis/SP
39	51/00	P	P	N	---	N	S. João da Boa Vista/SP
40	52/00	A	P	N	---	N	São Paulo/SP
41	57/00	?	N	P	N	N	Presidente Epitácio/SP
42	58/00	?	N	N	---	P	Presidente Epitácio/SP
43	59/00	?	N	P	N	P	Presidente Epitácio/SP
44	60/00	?	N	N	---	N	Presidente Epitácio/SP
45	61/00	?	N	N	---	P	Presidente Epitácio/SP
46	62/00	?	N	N	---	P	Presidente Epitácio/SP
47	64/00	?	P	N	---	P	Presidente Epitácio/SP
48	65/00	?	N	N	---	P	Presidente Epitácio/SP
49	01/01	?	N	N	---	N	Bragança Paulista 1/SP
50	02/01	?	N	N	---	N	Passos 1/ MG
51	03/01	?	N	N	---	N	Passos 1/ MG
52	04/01	?	N	P	N	N	Passos 1/ MG
53	05/01	?	N	N	---	N	Passos 1/ MG
54	06/01	?	N	N	---	N	Passos 1/ MG
55	08/01	?	N	N	---	N	Passos 1/ MG
56	09/01	?	N	P	N	N	Passos 1/ MG
57	10/01	?	N	P	P	N	Passos 1/ MG
58	11/01	?	N	P	N	N	Passos 1/ MG
59	12/01	?	N	P	P	N	Passos 1/ MG
60	13/01	?	N	N	---	N	Passos 1/ MG
61	15/01	?	N	P	P	N	Passos 1/ MG
62	18/01	?	N	N	---	N	Passos 1/ MG
63	19/01	?	N	P	P	N	Passos 1/ MG
64	20/01	?	N	P	N	N	Passos 1/ MG
65	22/01	?	N	P	N	N	Passos 1/ MG
66	23/01	?	N	P	P	N	Passos 1/ MG
67	24/01	?	N	P	N	N	Passos 1/ MG
68	25/01	?	N	P	P	N	Passos 1/ MG
69	07/01	?	N	N	---	N	Passos 2/ MG
70	14/01	?	N	N	---	N	Passos 2/ MG
71	16/01	?	N	P	N	N	Passos 2/ MG
72	17/01	?	N	P	P	N	Passos 2/ MG
73	21/01	?	N	N	---	N	Passos 2/ MG
74	26/01	?	N	N	---	N	Passos 2/ MG
75	27/01	?	N	N	---	N	Passos 2/ MG
76	28/01	?	N	N	---	N	Passos 2/ MG
77	29/01	?	N	N	---	N	Passos 2/ MG
78	30/01	?	N	N	---	N	Passos 2/MG
79	31/01	A	P	N	---	N	Barueri/SP
80	32/01	A	N	N	---	N	Barueri/SP
81	33/01	A	N	P	P	N	Barueri/SP



82	34/01	A	P	P	N	N	Barueri/SP
83	35/01	A	P	P	P	N	Barueri/SP
84	36/01	A	N	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
85	37/01	A	N	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
86	38/01	A	P	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
87	39/01	A	P	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
88	40/01	A	P	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
89	41/01	A	P	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
90	42/01	A	P	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
91	43/01	A	N	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
92	44/01	A	P	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
93	45/01	A	P	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
94	46/01	A	P	N	---	Nt	Nova Odessa/SP
95	73/01	A	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
96	74/01	P	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
97	75/01	P	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
98	76/01	A	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
99	77/01	A	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
100	78/01	A	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
101	79/01	P	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
102	80/01	A	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
103	81/01	P	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
104	82/01	A	N	P	N	N	Nova Odessa/SP
105	83/01	A	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
106	84/01	P	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
107	85/01	P	N	N	---	N	Nova Odessa/SP
108	47/01	P	N	N	---	N	Atibaia/SP
109	48/01	A	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
110	49/01	A	P	N	---	Nt	Viradouro/SP
111	50/01	A	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
112	51/01	P	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
113	52/01	A	P	N	---	Nt	Viradouro/SP
114	53/01	A	P	N	---	Nt	Viradouro/SP
115	54/01	A	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
116	55/01	A	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
117	56/01	A	P	N	---	Nt	Viradouro/SP
118	57/01	A	P	N	---	Nt	Viradouro/SP
119	58/01	A	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
120	59/01	A	P	N	---	Nt	Viradouro/SP
121	60/01	P	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
122	61/01	A	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
123	62/01	A	N	N	---	Nt	Viradouro/SP
124	63/01	A	P	N	---	Nt	Cravinhos 1/SP
125	64/01	A	N	N	---	Nt	Cravinhos 1/SP
126	65/01	A	P	N	---	Nt	Cravinhos 1/SP
127	66/01	A	P	N	---	Nt	Cravinhos 1/SP
128	67/01	A	N	P	N	Nt	Cravinhos 2/SP
129	68/01	A	N	N	---	Nt	Cravinhos 2/SP

130	69/01	A	N	N	---	Nt	Cravinhos 2/SP
131	70/01	A	N	N	---	Nt	Cravinhos 2/SP
132	71/01	A	N	N	---	Nt	Cravinhos 2/SP
133	72/01	A	N	N	---	Nt	Cravinhos 2/SP
134	01/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
135	02/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
136	03/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
137	04/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
138	05/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
139	06/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
140	07/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
141	08/02	?	P	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
142	09/02	?	P	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
143	10/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
144	11/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
145	12/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
146	13/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
147	15/02	?	P	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
148	16/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
149	17/02	?	P	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
150	18/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
151	19/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
152	20/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
153	21/02	?	P	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
154	22/02	?	P	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
155	23/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 2/SP
156	24/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 3/SP
157	25/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 3/SP
158	26/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 3/SP
159	27/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 3/SP
160	28/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 3/SP
161	29/02	?	P	N	---	Nt	Descalvado 3/SP
162	30/02	?	N	N	---	Nt	Descalvado 3/SP
163	31/02	A	P	P	P	N	S. Miguel Arcanjo/SP
164	32/02	A	N	P	N	N	S. Miguel Arcanjo/SP
165	33/02	A	N	N	---	N	S. Miguel Arcanjo/SP
166	34/02	A	P	P	N	N	S. Miguel Arcanjo/SP
167	35/02	A	P	P	N	N	S. Miguel Arcanjo/SP
168	36/02	A	N	N	---	N	S. Miguel Arcanjo/SP
169	37/02	A	N	P	P	N	S. Miguel Arcanjo/SP
170	38/02	A	N	P	N	N	S. Miguel Arcanjo/SP
171	39/02	A	P	P	N	N	S. Miguel Arcanjo/SP
172	40/02	A	N	N	---	Nt	S. Miguel Arcanjo/SP
173	41/02	A	N	P	N	N	S. Miguel Arcanjo/SP
174	42/02	A	N	N	---	N	S. Miguel Arcanjo/SP
175	43/02	P	N	P	N	P	S. Miguel Arcanjo/SP
176	44/02	A	N	P	P	N	S. Miguel Arcanjo/SP
177	45/02	A	P	P	N	N	S. Miguel Arcanjo/SP

178	46/02	A	N	N	---	N	S. Miguel Arcanjo/SP
179	47/02	A	N	N	---	N	S. Miguel Arcanjo/SP
180	48/02	A	N	N	---	Nt	S. Miguel Arcanjo/SP
181	49/02	A	N	N	---	P	S. Miguel Arcanjo/SP
182	50/02	A	N	N	---	Nt	S. Miguel Arcanjo/SP
183	51/02	?	N	N	---	N	Bragança Paulista 2/SP
184	52/02	?	P	P	P	N	Bragança Paulista 2/SP
185	53/02	?	P	P	N	N	Bragança Paulista 2/SP
186	54/02	?	P	P	N	N	Bragança Paulista 2/SP
187	55/02	?	N	P	P	N	Bragança Paulista 2/SP
188	56/02	?	N	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP
189	57/02	?	P	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP
190	58/02	?	P	N	---	Nt	Bragança Paulista 2/SP
191	60/02	?	N	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP
192	61/02	?	N	N	---	Nt	Bragança Paulista 2/SP
193	62/02	?	N	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP
194	63/02	?	P	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP
195	64/02	?	P	P	P	Nt	Bragança Paulista 2/SP
196	65/02	?	P	P	P	Nt	Bragança Paulista 2/SP
197	66/02	?	P	P	P	Nt	Bragança Paulista 2/SP
198	67/02	?	N	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP
199	68/02	?	N	N	---	Nt	Bragança Paulista 2/SP
200	72/02	?	N	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP
201	73/02	?	N	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP
202	75/02	?	P	N	---	Nt	Bragança Paulista 2/SP
203	77/02	?	N	P	N	Nt	Bragança Paulista 2/SP

P = positivo/ presente

N = negativo

A= ausente

? = desconhecido

Nt = não testado

--- = não aplicável