AMARILIS NOVAES D'ELBOUX BUNGER

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE3 E
5 DO CORONAVÍRUS DE PERUS (TCOV) ISOLADOS DE PERUS
COM SEVERA ENTERITE NO BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências
(Microbiologia).

São Paulo
2009

AMARILIS NOVAES D'ELBOUX BUNGER

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO GENE 3 E 5
DO CORONAVÍRUS DE PERUS (TCOV) ISOLADOS DE PERUS COM
SEVERA ENTERITE NO BRASIL**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio José
Piantino Ferreira

São Paulo
2009

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Bunger, Amarilis Novaes D'Elboux.

Detecção e caracterização molecular do gene 3 e 5 do coronavírus de perus (TCoV) isolados de perus com severa enterite no Brasil / Amarilis Novaes D'Elboux Bunger. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Antonio José Piantino Ferreira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Doenças aviárias.

Versão do título para o inglês: Detection and molecular characterization of gene 3 and 5 of turkey coronavirus (TCoV) from turkeys with severe enteritis in Brazil.

Descritores: 1. Coronavírus de peru 2. Gene 3 3. Gene 5 4. Análise filogenética 5. Caracterização molecular 6. RT-PCR I. Ferreira, Antonio José Piantino II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB093/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Amarilis Novaes D'Elboux Bungler.

Título da Tese: Detecção e caracterização molecular do gene 3 e 5 do
coronavírus de perus (TCoV) isolados de perus com severa
enterite no Brasil.

Orientador(a): Antonio José Piantino Ferreira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

A minha família:

*Meu pai José, minha mãe Neyde e meu irmão Rogério que sempre estão
ao meu lado me apoiando e me dando forças para seguir adiante.*

*Meu marido Guilherme, amor da minha vida, com o qual
divido minhas angústias e minhas felicidades.*

Ao meu filho Vinícius, razão do meu viver.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por que sei que andas comigo sempre e nos momentos mais difíceis me carrega em seus braços.

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira, pelos ensinamentos, apoio, paciência e compreensão nestes anos que trabalhamos juntos.

A Claudete Astolfi Ferreira pelo apoio, sugestões, orientações e atenção.

Ao Jorge Chacon, grande amigo e pesquisador, pela sua amizade e auxílios prestados.

Aos professores Andrea Micke Moreno, Paulo Eduardo Brandão e José Antonio Jerez por emprestar seus laboratórios e compartilhar seus conhecimentos.

Aos secretários do Departamento de Microbiologia e Pós-Graduação do Instituto de Ciências da USP: Alice e Celso pelo apoio e ajuda.

A todos os professores e funcionários da USP que me ajudaram na realização deste trabalho.

RESUMO

BUNGER, A. N. D. **Detecção e Caracterização Molecular do gene3 e 5 do Coronavírus de Perus (TCoV) isolados de perus com severa enterite no Brasil.** 2009. 51 f. Tese - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O coronavírus de perus (TCoV) é o agente etiológico associado a síndrome de mortalidade entérica das aves (PEMS). PEMS é uma enfermidade entérica, aguda e altamente contagiosa dos perus caracterizada por depressão, anorexia, diarreia e alta mortalidade em lotes de perus comerciais. A presença do coronavírus de perus (TCov) foi pesquisada em 29 amostras de conteúdo intestinal de perus entre 10 e 104 dias de idade que apresentaram enterite severa no período de 2004 a 2006. A detecção do TCoV foi realizada através da técnica da transcriptase reversa e da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), mediante a amplificação da região 3' UTR, seguida pela amplificação dos genes 3 e 5. A caracterização molecular dos vírus foi realizada mediante a amplificação dos genes 3 e 5, que mostrou similaridade genética entre as amostras, mas diferenças com as sequências dos outros TCOVs publicados previamente. Em relação ao gene 3, as amostras apresentaram maior relação com o vírus da bronquite infecciosa das aves (IBV), enquanto que com o gene 5 houve maior identidade com os coronavírus de faisão (PhCoV). Nossos resultados sugerem que a estratégia de amplificação da região 3' UTR provou ser uma estratégia eficaz para a detecção do TCoV em conteúdo intestinal.

Palavras-chave: Turkey coronavírus. Gene 3. Gene 5. Análise filogenética. Caracterização molecular. RT-PCR.

ABSTRACT

BUNGER, A. N. D. **Detection and Molecular characterization of gene 3 and 5 of Turkey Coronavirus (TCoV) from turkeys with severe enteritis in Brazil.** 2009. 51 p. Ph. D. Thesis - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Turkey coronavirus (TCoV) is causative agent associated to Poult Enteritis and Mortality Syndrome (PEMS) in turkeys worldwide. The disease is characterized by an acute highly contagious enteric disease of turkeys characterized by depression, anorexia, diarrhea and high mortality in commercial turkey flocks. The presence of turkey coronavirus (TCoV) in 29 intestinal content samples from turkey flocks aged between 10 and 104 days with severe enteritis was monitored in the period of 2004 to 2006. TCoV detection was accomplished by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), through amplification of the 3'UTR region, followed by amplification of genes 3 and 5. Molecular characterization of the viruses was done through amplification of genes 3 and 5, and showed evidence of genetic similarity between them, although they differed of sequences of other TCoVs described in the literature. In relation to gene 3, samples showed greater relationship with chicken infectious bronchitis virus (IBV), and while gene 5 showed greater identity with pheasant coronavirus (PhCoV). Our results suggest that the strategy of amplification of the 3'UTR region has proved to be an effective means of detection of TCoV in intestinal contents.

Key words: Turkey coronavirus. Gene 3. Gene 5. Phylogenetic analysis. Molecular characterization. RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático do coronavírus (www.nature.com/.../n12/fig_tab/nri1732_F1.html)	18
Figura 2- Organização genômica do coronavírus de humano 229E (HCoV 229E) (coronavírus do grupo 1), coronavírus da Hepatite de Murinos (MHV) (coronavírus do grupo 2) e coronavírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV) (coronavírus do grupo 3) (CAVANAGH et al., 2001)	20
Figura 3- Cromatograma gene 3	32
Figura 4- Cromatograma gene 5	34
Figura 5- Árvore filogenética para o gene 3	37
Figura 6- Árvore filogenética para o gene 5	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Primers que foram utilizados para a amplificação da região 3'UTR	25
Tabela 2- Primers utilizados para a amplificação do Gene 3 e do Gene 5	26
Tabela 3- Relação das amostras utilizadas, sinais e lesões clínicas das aves e resultados obtidos para os genes 3, 5 e para a região 3'UTR.....	29
 ANEXO A – TABELAS	 49
Tabela A.1 - Identidade dos nucleotídeos do gene 3 dos coronavírus de perus (TCoV) brasileiros comparados com o gene 3 do IBV, PhCoV and TCoV de diferentes regiões.	50
Tabela A.2 - Identidade dos nucleotídeos do gene 5 dos coronavírus de perus Brasileiros (TCoV) comparados com o gene 5 de outras sequencias de coronavírus.....	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Amostras	23
3.1.1 Preparação das amostras	23
3.2 Extração do RNA	23
3.3 Detecção da 3'UTR do TCoV	24
3.4 Detecção dos Genes 3 e 5 do TCoV	25
3.5 Sequenciamento de DNA	26
3.6 Filogenia	27
3.6.1 Número de acesso das seqüências utilizadas para a realização da árvore filogenética	27
3.7 Medidas para evitar contaminações nas reações de RT-PCR-Nested	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Números de acesso das seqüências detectadas neste trabalho	36
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO A - TABELAS	49

Tabela A.1 - Identidade dos nucleotídeos do gene 3 dos coronavírus de perus (TCoV) brasileiros comparados com o gene 3 do IBV, PhCoV and TCoV de diferentes regiões.50

Tabela A.2 - Identidade dos nucleotídeos do gene 5 dos coronavírus de perus Brasileiros (TCoV) comparados com o gene 5 de outras sequencias de coronavírus.....51

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas que afetam o trato digestivo de aves comerciais são de grande importância tanto em função das perdas econômicas que estas causam quanto pela afecção de outros sistemas das aves, o que, somado, leva à diminuição da produtividade. Mais especificamente, doenças do trato digestivo afetam o valor do lote pela depressão da porcentagem de crescimento, utilização ineficiente do alimento, diminuição da uniformidade do lote, incremento à susceptibilidade e ocorrência de outras doenças e incremento dos custos de medicação, sendo que os efeitos de doença no trato digestivo continuam muito tempo depois da recuperação clínica, podendo a mortalidade ser considerável (BARNES, 1997).

Os vírus são os agentes mais frequentes implicados na maioria das infecções que tem grande impacto na saúde da ave e na performance do lote. Estes incluem rotavírus, coronavírus, enterovírus, adenovírus, astrovírus e reovírus (GUY, 1998). As infecções gastrointestinais causadas por vírus são responsáveis pelo desenvolvimento de grande número de doenças extra gastrointestinais. Os vírus podem induzir alteração da mucosa intestinal, tornando esta porta de entrada para outros patógenos potenciais como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. Como consequência desta alteração na mucosa intestinal, podem ser desenvolvidas deficiências nutricionais, especialmente aquelas relacionadas com vitaminas lipossolúveis e minerais. Osteoporose e outras anormalidades esqueléticas são frequentemente encontradas em frangos de corte jovens que experimentam doenças gastrointestinais. Deficiências nutricionais que acontecem como resultados destas infecções também podem causar disparidade no crescimento e desenvolvimento de órgãos linfóides, particularmente a bursa de Fabrício e o timo. Os danos nestes órgãos linfóides podem resultar em deficiências imunológicas e incremento na susceptibilidade a outras doenças infecciosas (GUY, 1998).

Em 02 anos a constatação do número de espécies aviárias as quais os coronavírus têm sido encontrados dobrou. A maior parte destes coronavírus pertencia ao grupo 03, porém estudos sugerem que as infecções nas aves não estão limitadas aos coronavírus deste grupo. Experimentos mostraram que o coronavírus de bovinos (grupo 02) pode infectar e causar doenças entéricas em perus. Existe um grande potencial para o surgimento

de novas doenças relacionadas aos coronavírus nas aves, sendo estas de origem aviária ou de mamíferos (CAVANAGH, 2005).

Desde o surgimento do SARS-coronavírus em humanos em 2002 houve um maior interesse em estudos pelos coronavírus de outras espécies, incluindo as aves (CAVANAGH, 2005).

O coronavírus de perus (TCoV) afeta perus de todas as idades, mas a doença clínica é observada em aves jovens, geralmente nas primeiras semanas de vida. Os perus são os hospedeiros naturais do TCoV, mas experimentos realizados em galinhas demonstraram a infecção através da soroconversão e detecção do vírus e antígenos virais nos tecidos do intestino e da bursa de Fabrício, porém as galinhas não apresentaram sinais clínicos (GUY, 2008).

O coronavírus é eliminado nas fezes das aves infectadas ao longo de diversas semanas. A transmissão do vírus ocorre através da ingestão de fezes e do uso de materiais contaminados com fezes de aves infectadas. Geralmente o vírus se espalha rapidamente entre os lotes e fazendas vizinhas, devido ao movimento mecânico através de pessoas, equipamentos e veículos. Pássaros selvagens, ratos e cães entre outros animais, também servem de vetores mecânicos. Não há transmissão através do ovo, mas este pode ser contaminado através de fômites. O período de incubação varia de 01 a 05 dias, sendo mais frequente entre 02 e 03 dias (GUY, 2008).

O coronavírus de perus (TCoV) é um dos principais causadores de diarreia infecciosa nestas aves e é caracterizado por anorexia, diarreia aquosa, severa desidratação e decréscimo no ganho de peso (LOA et al., 2006). O TCoV é conhecido como um dos principais agentes envolvidos na PEMS (Síndrome de mortalidade entérica das aves) elevando os níveis de mortalidade nos plantéis (CARVER et al., 2001; YU et al., 2000; GUY et al., 1997).

A síndrome de mortalidade entérica das aves (PEMS) é uma enfermidade transmissível que afeta comumente perus jovens entre 01 a 04 semanas de idade. Esta doença é caracterizada por diarreia, anorexia, diminuição no crescimento, deficiência imune e alta mortalidade (YU et al., 2000; QURESHI et al., 2000).

A doença causada pelo TCoV é responsável por perdas econômicas significativas e é uma causa de problemas constantes aos produtores de perus, pois em locais onde as concentrações de perus é alta, a erradicação do vírus se torna muito difícil (LOA, 2006).

O TCoV foi primeiramente isolado por Peterson e Hymas, a partir de uma doença emergente em perus em 1951 (POMEROY e NAGARAJA, 1991). Este vírus causa uma diarreia líquida em perus entre 01 e 06 semanas de idade devido à severa atrofia dos vilos intestinais e desordens circulatórias que medeiam a tão conhecida doença da crista azul (MÖSTL, 1990; Brown et al., 1997). Entre os anos de 1950 e 1960 grandes perdas econômicas foram atribuídas a esta doença nos Estados Unidos e Canadá e entre 1951 e 1971, a doença da crista azul foi considerada a doença mais onerosa afetando a produção de perus em Minnesota (EUA). Em 1966 23% da mortalidade dos perus de Minnesota foram causadas por esta doença (GUY, 2008).

Dea et al. em 1990 através das técnicas de imunoblotting, imuno precipitação, vírus neutralização e inibição da hemaglutinação evidenciou uma relação antigênica entre o TCoV e BCoV, um coronavírus do grupo 02. Porém estudos posteriores têm demonstrado que TCoV apresenta uma relação filogenética próxima com o vírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV), sendo deste modo classificado dentro do grupo 03 dos coronavírus (BRESLIN et al., 1999; GUY et al., 1997).

O TCoV pertence a ordem Nidovirales ao gênero *Coronavírus*, família Coronaviridae, que compreende um grande grupo de vírus RNA capazes de infectar uma variedade de espécies, incluindo aves e mamíferos. Estes vírus são pleomórficos, envelopados, fita simples e senso positivo, medindo de 60-220 nm de diâmetro (VELAYUDHAN, 2003).

O termo “Coronavírus” é derivado do latim corona devido a aparência das glicoproteínas da superfície do vírion em forma de “coroa” visualizado através da microscopia eletrônica (TYRREL, 1968). O gênero coronavírus é também dividido em três sorogrupos, definidos de acordo com epítopos presentes nas glicoproteínas do envelope (BRANDÃO et al., 2001).

No Grupo 01 estão inclusos os seguintes coronavírus:

- Coronavírus da Gastroenterite transmissível dos suínos (TGEV);
- Coronavírus felino (FCoV);
- Coronavírus canino (CECoV);
- Coronavírus Humano 229-E (HCoV);
- Coronavírus Respiratório suíno;
- Coronavírus da Diarréia Epidêmica suína (PEDV).

O Grupo 02 inclui:

- Coronavírus Bovino (BCoV);
- Coronavírus Humano OC-43 (HCoV OC43);
- Coronavírus da Encefalomielite Hemaglutinante Suína (HEV);
- Coronavírus da Hepatite de Murinos (MHV);
- Coronavírus da Pufinose;
- Coronavírus respiratório canino (CRCoV);
- SARS-coronavírus (SARS-CoV).

O Grupo 3 compreende:

- Coronavírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV);
- Coronavírus de Perus (TCoV);
- Coronavírus de faisão (PhCoV);
- Coronavírus de gansos (GCoV);
- Coronavírus dos patos (DCoV);
- Coronavírus dos pombos (PiCoV) (RISCO et al., 1996; LAI e CAVANAGH, 1997; BRANDÃO et al., 2001; CAVANAGH, 2005).

A replicação do TCoV ocorre nos enterócitos do jejuno e íleo e no epitélio da bursa de Fabrício. Durante a replicação citoplasmática dos coronavírus, ocorre a síntese de uma fita genômica completa de polaridade negativa que servirá como molde para a síntese do RNA genômico de polaridade positiva. Entretanto, também são sintetizados múltiplos RNAs subgenômicos que atuarão como RNAm das proteínas virais. Experimentos com células infectadas pelo coronavírus demonstraram diferença considerável no número de RNAs subgenômicos transcritos entre os genes codificantes de proteínas estruturais (SPAAN et al., 1983).

O RNA genômico dos coronavírus tem um tamanho de 27 a 32 kb, sendo o maior de todos os genomas dos vírus RNA. Todos os coronavírus possuem estrutura genômica semelhante, organizada em 07 a 10 janelas de leitura aberta (ORF) de acordo com o grupo antigênico ao qual pertence. O primeiro segmento genômico abrange cerca de dois terços da extremidade 5' do genoma, e compreende duas ORFs sobrepostas (ORF1a e ORF1b). Estas ORFs são traduzidas em uma poliproteína, que é o precursor da polimerase viral. No terço genômico restante estão organizados quatro genes codificadores de proteínas estruturais que são comuns em todas as espécies, na seguinte ordem: glicoproteína da espícula (S), proteína do envelope (E), proteína de membrana (M) e a proteína do nucleocapsídeo (N). Algumas espécies que constituem o grupo 02 dos coronavírus, como o BCoV e o MHV, possuem adicionalmente uma glicoproteína de membrana denominada hemaglutinina esterase (HE) (FISCHER et al., 1997; SENANAYAKE e BRIAN, 1997). Adicionalmente, estes genes intercalam-se com variadas ORFs codificantes de proteínas não estruturais, que diferem em número, sequência de nucleotídeos, organização e expressão entre os coronavírus (LAI e CAVANAGH, 1997).

Figura 1- Desenho esquemático do coronavírus (www.nature.com/.../n12/fig_tab/nri1732_F1.html).

A glicoproteína S dos coronavírus desempenha importantes funções na patogênese viral incluindo a interação inicial do vírus à célula hospedeira, disseminação viral célula a célula e como determinante de tropismo tecidual. A interação inicial do vírus ocorre por meio da ligação da proteína da espícula com receptores celulares específicos. A capacidade dos coronavírus se replicarem em determinadas linhagens celulares depende, exclusivamente, da sua capacidade de interação com o receptor celular (CAVANAGH, 1995). Embora seja reconhecida a atividade hemaglutinante da glicoproteína HE, experimentos têm demonstrado que a glicoproteína S é uma hemaglutinina muito mais potente do que a HE (SCHULTZE et al., 1991). A proteína S forma projeções de cerca de 20 nm de comprimento, responsáveis pela aparência espiculada do vírion e pela atividade hemaglutinante. Anticorpos neutralizantes são principalmente induzidos pela proteína S (COLLINS et al., 1982). A proteína completa tem um peso molecular de 180 kDa e é clivada em duas subunidades S1 e S2 (CAVANAGH, 1995). A subunidade S1 contém um domínio de ligação ao receptor celular, bem como uma região hipervariável. A subunidade S2 é altamente conservada, contendo características comuns de muitas proteínas virais de fusão, bem como um domínio transmembrana. Acredita-se que esses domínios sejam

importantes para a entrada do vírus na célula e no processo de fusão célula a célula (WEISS e NAVAS-MARTIN, 2005).

A glicoproteína de Membrana (M) é uma das proteínas estruturais (a outra é a proteína E) que são essenciais para a produção de partículas coronavírus-like. Esta glicoproteína, composta por 225 – 230 aminoácidos têm um papel importante na formação do envelope e do core interno do vírion. Algumas propriedades da proteína M sugerem que esta esteja envolvida na montagem das partículas do vírus (LAI e CAVANAGH, 1997; CLARK, 1993).

Entre os genes S e M temos o gene 3 que contém 03 ORFs, 3a (174 nucleotídeos), 3b (195 nucleotídeos) e 3c (321 nucleotídeos). A ORF 3c é a que codifica a proteína de membrana E. Esta pequena proteína de membrana, composta de 84 a 109 aa, é outra proteína de envelope necessária à montagem de partículas virais (BOS et al., 1996; VENNEMA et al., 1996; LAI et al., 1997). Para algumas espécies de coronavírus, as células que expressam somente as proteínas M e E tem demonstrado serem suficientes para a formação de estruturas semelhantes às partículas virais (de HAAN et al., 1998). A capacidade de induzir apoptose em células infectadas também tem sido atribuída à proteína E (AN et al., 1999).

A proteína N é uma fosfoproteína que associada ao RNA genômico forma o nucleocapsídeo helicoidal (LAPPS et al., 1987; CLARK, 1993). Além de desempenhar função estrutural, a proteína N também participa nos processos de transcrição e replicação viral (COMPTON et al., 1987). O gene que codifica a proteína N é altamente conservado entre os isolados da mesma espécie e o número de RNAs subgenômicos transcritos para essa proteína é significativamente maior nas células infectadas pelos coronavírus quando comparado às demais proteínas estruturais (HISCOX et al., 2001).

Presente no RNA do TCOV existe uma região não-traduzida na extremidade 3' conhecida como 3'UTR que se encontra após a extremidade 3' do gene N e acredita-se que esta região seja importante na iniciação da síntese da fita negativa de RNA. Esta região apresenta-se altamente conservada entre diferentes amostras de uma mesma espécie de coronavírus (BRESLIN et al., 1999).

Entre os genes M e N está o gene 5, onde apenas os coronavírus do grupo 03 apresentam 02 ORFs, 5a e 5b que codificam as proteínas não estruturais 5a e 5b (JIA, et al., 1997). O TCoV possui a mesma ordem de apresentação dos genes que o IBV (CAVANAGH et al., 2001).

Figura 2- Organização genômica do coronavírus de humano 229E (HCoV 229E) (coronavírus do grupo 1), coronavírus da Hepatite de Murinos (MHV) (coronavírus do grupo 2) e coronavírus da Bronquite Infecciosa das Galinhas (IBV) (coronavírus do grupo 3) (CAVANAGH et al., 2001).

Pouco se conhece sobre as funções das proteínas não estruturais (3a, 3b, 5a e 5b). Esta região parece ser única dos coronavírus do grupo 03, assim como o gene HE que é encontrado somente no grupo 02 (CAVANAGH et al., 2001, 2002; GUY, 2000; BREDENBEEK et al., 1990). Apesar de estas regiões serem consideradas conservadas entre os coronavírus deste grupo, as regiões 3b e 5b são ainda mais conservadas que as

demais. Pequenas ORFs similares intercaladas entre os genes estruturais S, E, M e N são encontradas em outros coronavírus, mas a identidade nucleotídica e localização destes grupos específicos de genes variam entre os diferentes vírus. Estes genes são conhecidos como genes acessórios, sendo dispensáveis para a replicação. Amostras que apresentam deleção destes genes permanecem viáveis pelo menos *in vitro* (JIA et al., 1997; HODGSON et al., 2006; SHEN et al., 2003).

Alguns destes genes acessórios devem estar relacionados com especificidade em relação a seus hospedeiros, tropismo por células e patogenicidade. Contudo, os efeitos dos produtos destes genes nos animais e a função destas ORFs, que foram mantidas durante a evolução, não foram ainda elucidadas (HERREWEGH et al., 1995; WESLEY et al., 1990; DE HAAN et al., 2002; SHEN et al., 2003).

No Brasil a produção comercial de perus concentra-se na região sudeste do país. Em 2007 foram abatidas 40 milhões de aves com um crescimento de 13, 38% sobre o número atingido em 2006. O Brasil é o 2º maior exportador mundial de produtos de perus, atrás somente dos EUA [UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBA, 2009)] (<www.uba.org.br/uba_rel08_internet.pdf>). Villarreal et al., 2006 foi o 1º artigo a relatar a presença do TCoV em 17 lotes de perus, sendo a primeira descrição de PEMS envolvendo coronavírus de perus no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 Detecção do coronavírus de perus através da técnica de Nested-RT-PCR da região 3'UTR (região não traduzida 3') em fezes de perus que apresentavam problemas entéricos.

2.2 Detecção dos Genes 3 e 5 através da técnica RT-PCR.

2.3 Caracterização molecular e filogenia dos coronavírus de perus encontrados através do sequenciamento das amostras positivas para o gene 3 e 5.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram colhidas 29 amostras de conteúdo intestinal de perus, enviadas ao laboratório de Ornitopatologia da FMVZ-USP para diagnóstico viral, que apresentavam problemas entéricos. Os sintomas e lesões descritos nas fichas clínicas dos animais eram: enterite, diminuição no consumo de ração, prostração, apatia, diarreia severa, penas eriçadas (aves encorujadas), nervosismo, mortalidade acentuada, queda de produção e refugagem. As idades das aves variaram entre 13 até 104 dias. As amostras foram enviadas de nove granjas da região sul e sudeste no período de janeiro de 2004 até junho de 2006.

3.1.1 Preparação das amostras

As amostras fecais foram preparadas como suspensões a 20% em PBS 0, 01 M/BSA 0, 1% pH 7, 2 e clarificadas a 12. 000 x g por 30 minutos a 4 °C, colhendo-se o sobrenadante. Como controle negativo foi utilizado PBS 0, 01 M pH 7, 2 e como controle positivo foi usada a cepa vacinal Holland H120 (Bronquite infecciosa das galinhas) (Intervet do Brasil).

3.2 Extração do RNA

A extração de RNA para a detecção do TCoV para as amostras de campo, amostras padrão e o controle negativo seguiu o seguinte protocolo:

- a) foi homogeneizado 0,75 ml de Trizol (Invitrogen™) com 0,25 ml de suspensão fecal;
- b) incubação por 5' a temperatura ambiente;
- c) foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio (para cada 0,75ml de Trizol™) e homogeneizado em vortex por 15";
- d) incubação por 15' a temperatura ambiente;
- e) centrifugação a 12000 g por 15' a 4 °C;
- f) a fase aquosa foi transferida para outro tubo;

- g) adição de 0,5 ml de álcool isopropílico (para cada 0,75 ml de TrizolTM);
- h) incubação por 10' em gelo;
- i) centrifugação a 12000 g por 15' a 4 °C;
- j) o sedimento foi lavado com etanol 75%;
- k) homogeneização em vortex;
- l) centrifugação a 12000 g por 10' a 4 °C;
- m) após secar o sedimento o mesmo foi ressuspensionado em 20 µl de água DEPC;
- n) incubação a 56 °C por 10'.

3.3 Detecção da 3'UTR do TCoV

Para detectar o coronavírus nas amostras foi utilizada uma reação de Nested RT-PCR que amplifica um segmento de 179 pb da região 3'UTR (região não traduzida 3') dos coronavírus, utilizando primers específicos UTR 41, UTR 11 e UTR 31 em condições de reação descritos por Cavanagh et al. (2002). A RT-PCR seguiu o protocolo abaixo.

Síntese de c-DNA (transcrição-reversa) - Foram denaturados 7 µL do RNA extraído a 95 °C por 5 minutos e adicionados ao mix da transcrição reversa contendo 1 x First Strand Buffer, 1 mM de cada dNTP, DTT 10 mM, 20 pmol de cada primer (UTR 41 e UTR 11) e 200U M-MLV Transcriptase reversa (InvitrogenTM) para uma reação final de 20 µL. A transcrição reversa foi realizada a 45 °C/60' seguidos de 10' a 72 °C.

PCR – 5 µL do c-DNA foi adicionado ao mix do PCR (1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0.2 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada primer (UTR 41 e UTR 11), 1.5 mM MgCl₂, 28.25 µL de água ultra pura e 1.25U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM) para uma reação final de 50 µL e submetida ao ciclo 94 °C por 1'/48 °C por 1,5'/72 °C por 2' (30 vezes).

NESTED - 5 µL do produto de PCR foi adicionado ao mix do nested (1 x PCR Buffer (InvitrogenTM), 0.2 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada primer (UTR 41 e UTR 31), 1.5 mM MgCl₂, 28.25 µL de água ultra pura e 1.25U de Taq DNA polimerase (InvitrogenTM) para uma reação final de 50 µL e submetido ao mesmo ciclo utilizado na reação de PCR.

Eletroforese em gel de agarose – Para a visualização dos resultados foi utilizado um gel de agarose (Invitrogen™) a 1, 5%, onde as amostras foram aplicadas e posteriormente submetidas a uma corrente elétrica de potência de 100V, juntamente com as amostras eram colocados um padrão de bandas conhecidas (ladder100pb). Após a corrida o resultado era visto através de um transiluminador.

Tabela 1. Primers que foram utilizados para a amplificação da região 3'UTR.

NOME	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
UTR 41	5' ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC 3'	266 pb
UTR 11	5' GCTCTAACTCTATACTAGCCTA 3'	
UTR 31	5' GGGCGTCCAAGTGCTGTACCC 3'	179 pb

3.4 Detecção dos Genes 3 e 5 do TCoV

As amostras positivas para a região 3'UTR foram selecionadas e novas RT-PCR foram feitas para a identificação dos genes 3 e 5 seguindo o protocolo abaixo:

Síntese de c-DNA (transcrição-reversa) - foram denaturados 7 µL do RNA extraído a 95 °C por 5 minutos e adicionados ao mix da transcrição reversa contendo 1 x First Strand Buffer, 1 mM de cada dNTP, DTT 10 mM, 20 pmol de cada primer (PS4 + , PM4 - gene 3 e PM1 + e PN3 - gene5) e 200U M-MLV Transcriptase reversa (Invitrogen™) para uma reação final de 20 µL. A transcrição reversa foi realizada a 45 °C/60' seguidos de 10' a 72 °C.

PCR - 5 µL do c-DNA foi adicionado ao mix do PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen™), 0.2 mM de cada dNTP, 25 pmol de cada primer (PS4 + PM4 - gene 3 e PM1 + e PN3 – gene 5), 1.5 mM MgCl₂, 28. 25 µL de água ultra pura e 1.25U de Taq

DNA polimerase (Invitrogen™) para uma reação final de 50 µL e submetida ao ciclo 94 °C por 1’/50 °C por 1, 5’/ 72 °C por 2’ (30 vezes).

Eletroforese em gel de agarose – Para a visualização dos resultados foi utilizado um gel de agarose (Invitrogen™) a 1,5%, onde as amostras foram aplicadas e posteriormente submetidas a uma corrente elétrica de potência de 100V, juntamente com as amostras eram colocados um padrão de bandas conhecidas (ladder 100pb). Após a corrida o resultado era visto através de um transiluminador.

Tabela 2. Primers utilizados para a amplificação do Gene 3 e do Gene 5.

NOME	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
PS4 +	5’ TGAGTAAGTGTGGTAAGAAATC 3’	912 pb
PM4 -	5’ CAAAAGCACCATAACACTATCAT 3’	Gene 3
PM1 +	5’ CTGGCGAGCTAGAAAGTGTA 3’	861 pb
PN3 -	5’ GCTTTTATTGCTTGAAACCAAGAT 3’	Gene5

3.5 Sequenciamento de DNA

Cinco amostras positivas para o gene 3 e 5 foram sequenciadas, conforme o protocolo abaixo:

Os fragmentos de 912 e 861 pares de base contendo os genes 3 e 5 respectivamente, obtidos para cada amostra conforme o item anterior, foram submetidos a sequenciamento de DNA.

Primeiramente, os produtos de PCR foram purificados com o kit Concert (Invitrogen™), quantificado visualmente com Low Mass DNA Ladder (Invitrogen™) de acordo com as instruções do fabricante e submetido ao sequenciamento de DNA em sequenciador automático ABI-310 (Applied Biosystems™).

A reação de sequenciamento consistiu em 4 µL de BigDye 3 (Applied Biosystems™), 4 µL de Tampão Save Money 5x, 4 pmol de cada primer senso e antisenso

em reações separadas e 10 ng do DNA alvo para uma reação final de 20 µL, levando-se ao termociclador PTC-200 (MJ Research TM) 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 80 µL de isopropanol a 75%, incubando-se durante 20 minutos, centrifugando-se a 12. 000 x g/ 25', removendo-se o sobrenadante e adicionando-se 250 µL de etanol a 70%, centrifugando-se a 12.000 x g/5' e secando-se o precipitado.

3.6 Filogenia

Os cromatogramas que foram gerados para cada uma das sequencias senso e antisenso de cada amostra foram conferidos manualmente com o programa Chromas v. 2. 23 (© 1998-2002 Technelysiu mM Pty LTD) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciada. A sequencia consenso final de cada amostra foi obtida a partir das sequencias senso e o reverso-complemento das sequencias anti-senso de cada amostra alinhadas com o programa Bioedit v. 5.0.9 (© 1997-2001 Tom Hall), sendo a mesma submetida ao BLASTn para confirmação do sequenciamento.

A árvore filogenética para os genes 3 e 5 foi construída com as sequencias consensuais de cada amostra alinhada com o programa Bioedit, usando as sequencias dos coronavírus presentes no banco de dados do Genbank e foram conferidos manualmente o alinhamento, obtendo-se a árvore de máxima parcimônia consenso com o algoritmo exato “branch-and-bound” e os valores de “bootstrap” com o programa Mega (© 2001 Kumar, Tamura, Jakobsen; Nei). As identidades entre as sequencias alinhadas foram calculadas com o programa Bioedit.

3.6.1 Número de acesso das seqüências utilizadas para a realização da árvore filogenética

Gene 3. IBV Beaudette (DQ001338), IBV Beaudette (DQ001339), IBV Beaudette (NC_001451), IBV Peafowl/GD/KQ6/2003 (AY641576), IBV LKQ3 (AY702085), IBV LDT3 (AY702975), IBV CK/CH/LSHH/03I (AY842867), IBV Jilin (AY846833), IBV

Connecticut (AY942752), PhCoV ph/UK/602/95 (AJ618988), TCoV turkey/UK/412/00 (AJ310640), TCoV-ATCC (EU022526), TCoV-540 (EU0225250), TCoV-MG10 (NC_010800), TCoV- MG10 (EU095850).

Gene 5. IBV Jilin (AY839142), IBV Connecticut (AF469013), IBV Alabama 1 (AF470626), IBV Iowa (AF469014), IBV LKQ3 (AY702085), IBV Beaudette (DQ001339), IBV Beaudette (DQ001338), IBV Beaudette US (AJ311362), IBV Beaudette (NC_001451), IBV D41 (AY846837), IBV W93 (AY842860), IBV IBN (AY856346), IBV Peafowl/GD/KQ6/2003 (AY641576), IBV HN (DQ007017), IBV JAAS (AY839139), IBV CK/CH/LHLJ/99I (AY842863), IBV CK/CH/LJL/04I (AY839141), IBV CK/CH/LSHH/03I (AY839136), IBV LDT3 (AY702975), TCoV Indiana (AF072913), TCoV Minnesota (AF072911), TCoV turkey/UK/412/00 (AJ310641), TCoV NC95 (AF072912), PhCoV ph/UK/602/95 (AJ619604), TCoV-ATCC (EU022526), TCoV-540 (EU0225250), TCoV-MG10 (NC_010800), TCoV- MG10 (EU095850).

3.7 Medidas para evitar contaminações nas reações de RT-PCR-Nested

Cada etapa das reações de RT-PCRs (extração de RNA, preparo de reagentes, RT-PCR e nested e eletroforese) e de sequenciamento foram realizadas em uma sala separada e com materiais exclusivos para cada sala. Além disso, na fase de nested, um tubo contendo água ultra-pura ao invés de amostra foi adicionado entre cada 04 tubos de amostras para monitoramento de contaminações por DNA amplificado.

4 RESULTADOS

Das 29 amostras de conteúdo intestinal que chegaram ao laboratório com problemas entéricos, 24 foram positivas para a região não traduzida 3'. Destas, 12 amostras foram positivas para o gene 3 e 9 foram positivas para o gene 5, com 9 co-positividades entre o gene 3 e 5. Apenas 3 amostras positivas para 3' UTR e gene 3 foram negativos para o gene 5. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Relação das amostras utilizadas, sinais e lesões clínicas das aves e resultados obtidos para os genes 3,5 e para a região 3'UTR.

Amostras	Idade em dias	3'UTR	Gene3	Gene5	Sinais e lesões Clínicas
TCoV/Brasil/2004/USP176	13	+	+	+	Diarréia e enterite
TCoV/Brasil/17PNPO2 M	60	+	-	-	Diarréia, prostração, diminuição consumo de ração.
TCoV/Brasil/USP17PNPO2 F	60	+	-	-	Diarréia, prostração, diminuição consumo de ração.
TCoV/Brasil/2004/USP D	19	+	-	-	Diarréia, diminuição de peso e inquietação.
TCoV/Brasil/2004/USP 01	91	+	+	-	Diarréia, diminuição de peso e inquietação.
TCoV/Brasil/2004/USP 02	91	+	-	-	Diarréia severa refugagem.
TCoV/Brasil/2004/USP30150/03 Bm	19	-	-	-	Diarréia severa
TCoV/Brasil/2004/USP30150/03	19	+	-	-	Diarréia

(continua)

Tabela 3 (continuação).

TCoV/Brasil/2004/USP30217/03	14	+	-	-	Diarréia severa
TCoV/Brasil/2004/USP173 B	49	+	+	+	Diarréia, diminuição de peso, penas eriçadas e inquietação.
TCoV/Brasil/2004/USP173 A	49	+	-	-	Diarréia, diminuição de peso, penas eriçadas e inquietação.
TCoV/Brasil/2004/USP174	49	+	+	+	Diarréia, diminuição de peso, penas eriçadas e inquietação.
TCoV/Brasil/2004/USP175	49	-	-	-	Diarréia, enterite.
TCoV/Brasil/2004/USP252/04	30	-	-	-	Diarréia severa.
TCoV/Brasil/2004/USP C	29	+	+	+	Diarréia, diminuição de peso, e inquietação.
TCoV/Brasil/2004/USPB	10	+	+	+	Diarréia, diminuição de peso, e inquietação.
TCoV/Brasil/2004/USP NPO6	19	+	+	+	Diarréia, diminuição de peso, e inquietação.
TCoV/Brasil/2005/USP 20	25	+	+	-	Diarréia, refugagem.
TCoV/Brasil/2005/USP 21	23	+	-	-	Diarréia, amontoamento, refugagem e apatia.
TCoV/Brasil/2005/USP 22	104	+	+	-	Diarréia, baixo ganho de peso, apatia.

(continua)

Tabela 3 (continuação).

TCoV/Brasil/2005/USP 23	100	+	+	+	Diarréia intensa de coloração caramelada
TCoV/Brasil/2005/USP 24	25	+	-	-	Diarréia, prostração, fraqueza.
TCoV/Brasil/2005/USP 89	25	+	-	-	Diarréia, aves deprimidas.
TCoV/Brasil/2006/USP 2205	23	+	+	+	Diarréia espumosa apatia
TCoV/Brasil/2006/USP 2405	23	+	-	-	Diarréia espumosa apatia
TCoV/Brasil/2004/USP NPO2	25	+	-	-	Diarréia, amontoamento, refugagem e apatia.
TCoV/Brasil/2006/USP2605	23	+	+	+	Diarréia, amontoamento, refugagem e apatia.
TCoV/Brasil/2006/USP NP 36	100	-	-	-	Diarréia espumosa, apatia e queda de produção.
TCoV/Brasil/2006/USP 97 D	28	-	-	-	Diarréia, mortalidade acentuada.

Nota: (+) = positivo (-) = negative

(conclusão)

Não foram encontradas contaminações por DNA amplificado, uma vez que as reações referentes aos controles negativos não apresentaram bandas, sendo estas presentes apenas nos controles positivos e nas amostras positivas.

As 05 amostras seqüenciadas para o gene 5 apresentaram cromatograma com picos altos e bem definidos, gerando desta forma 05 sequencias boas para serem estudadas. Com as amostras do gene 3 somente 02 amostras apresentaram-se completas e bem definidas, tendo que ser descartada as demais amostras.

AY641576 IBV Peafowl/GD/KQ6/20	10 20 30 40 50 60 70	CGTCCCTTCCTAATAGTATTAAATTTTCTTTGGGTAAA-CTTGACTAAGTTGTTTATAGAGAGTTTATTA
AY702085 IBV LKQ3		CGTCCCTTCCTAATAGTATTAAATTTTCTTTGGGTAAA-CTTGACTAAGTTGTTTATAGAGAGTTTATTA
AY846833 IBV		CATCTTTTCTAATAGTATTAAATTTTCTTTGGGTAAA-CTTGCACTAAGTTGTTTAAAGAGTGTGTTA
DQ001338 IBV EP3		CGTCCCTTCCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGACTAAGTTGTTTATAGAGAGTTTATTA
DQ001339 IBV p65		CGTCCCTTCCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGACTAAGTTGTTTATAGAGAGTTTATTA
AY942752 IBV Conn		CATCTTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGATTAAAGTTGTTTAAAGAGTGTGTTT
AY702975 IBV LDT3		CATCTTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGCTAAGTTGTTTATAGAGAGTGTGTTT
AY842867 CK/CH/LSHM/03I		CATCTTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGCTAAGTTGTTTAAAGAGTGTGTTT
NC_001451 IBV		CGTCCCTTCCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGACTAAGTTGTTTATAGAGAGTTTATTA
AJ618988 PHCov ph/UK/602/95		CATCATTCTTAATTTCTATTAACTCTTTTGTGGGTAAA-CTTGTAATAATTTGTTTATAGTGAATCCTTG
AJ310640 TCoV UK/412/0		CATCCCTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGCAATAAGTTGTTTAAAGAGTGTGTTA
NC_010800 TCoV		CATCTTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGCTTAAGTTGTTTAAAGAGTGTGTTT
EU022526 TCoV ATCC		CATCTTTTCTAATAGTATTAACTCTTTTGTGGGTAAA-CTTGCTTAAGTTGTTTAAAGAGTGTGTTT
EU022525 TCoV 540		CATCTTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGCTTAAGTTGTTTAAAGAGTGTGTTT
EU095850 TCoV MG10		CATCTTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGCTTAAGTTGTTTAAAGAGTGTGTTT
TCoV/Brazil/2004/USP B		CATCCCTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGCTTAAGTTGTTTATAGAGAGTGTGTTT
TCoV/Brazil/2004/USP Npo6		CATCCCTTTCTAATAGTATTAAATTTCTTTGGGTAAA-CTTGCTTAAGTTGTTTATAGAGAGTGTGTTT
AY641576 IBV Peafowl/GD/KQ6/20	110 120 130 140 150 160 170	TCCAAATTATCAATAGTAACTTACAGCCTAGACTGACCCCTTTGTCAAGTCTAGACTAATGTTAAACTTA
AY702085 IBV LKQ3		TCCAAATTATCAATAGTAACTTACAGCCTAGACTGACCCCTTTGTCAAGTCTAGACTAATGTTAAACTTA
AY846833 IBV		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTTCTGCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAGATTTT
DQ001338 IBV EP3		TCCAAATTATCAATAGTAACTTACAGTCTAGACTGACCCCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAAACTTA
DQ001339 IBV p65		TCCAAATTATCAATAGTAACTTACAGTCTAGACTGACCCCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAAACTTA
AY942752 IBV Conn		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTTCTGCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAGATTTT
AY702975 IBV LDT3		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTGACCCCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAGATTTT
AY842867 CK/CH/LSHM/03I		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTGACCCCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAAATTTT
NC_001451 IBV		TCCAAATTATCAATAGTAACTTACAGTCTAGACTGACCCCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAAACTTA
AJ618988 PHCov ph/UK/602/95		TCCAAATTGTTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTCCTGCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAACTTT
AJ310640 TCoV UK/412/0		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTTCTGCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAGATTTT
NC_010800 TCoV		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGGCTAGACTTCTGCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAGATTTT
EU022526 TCoV ATCC		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTTCTGCTTTGGCAGAGGCTAGACTAATGTTAGATTTT
EU022525 TCoV 540		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTTCTGCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAGATTTT
EU095850 TCoV MG10		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGGCTAGACTTCTGCTTTGGCAGAGTCTAGACTAATGTTAGATTTT
TCoV/Brazil/2004/USP B		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTGACCCCTTTGCAAGTCTAGACTA-TGTTAGATTTT
TCoV/Brazil/2004/USP Npo6		TCCAAATTATTAATAGTAACTTACAGTCTAGACTGACCCCTTTGCAAGTCTAGACTA-TGTTAGATTTT
AY641576 IBV Peafowl/GD/KQ6/20	210 220 230 240 250 260 270	ATTCAAAAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGTATTAAACACAGAAATATTGACCCCTTT
AY702085 IBV LKQ3		ATTCAAAAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGTATTAAACACAGAAATATTGACCCCTTT
AY846833 IBV		ATTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAAAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
DQ001338 IBV EP3		ATTCAAAAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGTATTAAACACAGAAATATTGATCCCTTT
DQ001339 IBV p65		ATTCAAAAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGTATTAAACACAGAAATATTGATCCCTTT
AY942752 IBV Conn		ATTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
AY702975 IBV LDT3		ATACAAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
AY842867 CK/CH/LSHM/03I		TTACAAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
NC_001451 IBV		ATTCAAAAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGTATTAAACACAGAAATATTGATCCCTTT
AJ618988 PHCov ph/UK/602/95		GTTCAAAAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCATATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
AJ310640 TCoV UK/412/0		ATTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGGCTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
NC_010800 TCoV		ATTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
EU022526 TCoV ATCC		ATTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
EU022525 TCoV 540		ATTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
EU095850 TCoV MG10		ATTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
TCoV/Brazil/2004/USP B		ACTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
TCoV/Brazil/2004/USP Npo6		ACTCAACAAA-TCAGTTTCAATTTACAGCAATTTCAAGTGTGCTAAGCATGAAATATTGACCCCTTT
AY641576 IBV Peafowl/GD/KQ6/20	310 320 330 340 350 360 370	TGGGAAATAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAAAT
AY702085 IBV LKQ3		TGGGAAATAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAAAT
AY846833 IBV		TGGGAGTTAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
DQ001338 IBV EP3		TGGGAAATAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
DQ001339 IBV p65		TGGGAAATAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
AY942752 IBV Conn		TGGGAGTTAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
AY702975 IBV LDT3		TATGAAATAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
AY842867 CK/CH/LSHM/03I		TATGAAATAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
NC_001451 IBV		TGGGAAATAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
AJ618988 PHCov ph/UK/602/95		TGGGAGTTAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
AJ310640 TCoV UK/412/0		TGGGAGTTAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
NC_010800 TCoV		TGGGAGTTAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC
EU022526 TCoV ATCC		TGGGAGTTAGAGTCAAGTGAAGATTGTTGAGGTGATGATGAATTTATTGAATAAGTCGCTAGAGGAGAAC

Figura 3- Cromatograma gene 3 (continua).

Figura 3- Cromatograma gene 3 (conclusão).

Figura 4- Cromatograma gene 5 (continua).

[illegible]

Figura 4- Cromatograma gene 5 (conclusão).

4.1 Números de acesso das seqüências detectadas neste trabalho

Gene 3. TCoV/Brazil/2004/USP-B gene 3a (EU570234), TCoV/Brazil/2004/USP-B gene 3b (EU622496), TCoV/Brazil/2004/USP-B gene E (EU622497),

TCoV/Brazil/2004/USP-Npo6 gene 3a (EU570232), TCoV/Brazil/2004/USP-Npo6 gene 3b (EU570233), TCoV/Brazil/2004/USP-Npo6 gene E (EU622495).

Gene 5. TCoV/Brazil/2004/USP-B gene 5a (EU570222), TCoV/Brazil/2004/USP-B gene 5b (EU570229), TCoV/Brazil/2004/USP-Npo6 gene 5a (EU570223), TCoV/Brazil/2004/USP-Npo6 gene 5b (EU570231), TCoV/Brazil/2004/USP-174 gene 5a (EU570226), TCoV/Brazil/2004/USP-174 gene 5b (EU570230), TCoV/Brazil/2004/USP-23 gene 5a (EU570225), TCoV/Brazil/2004/USP-23 gene 3b (EU570228), TCoV/Brazil/2004/USP-176 gene 5a (EU570224), TCoV/Brazil/2004/USP-176 gene 5b (EU570227).

Na árvore filogenética as amostras do gene 3 estudadas apareceram em um mesmo grupo e este está mais próximo dos grupos das amostras de IBV do que as do TCoV. As amostras do gene 5 também se agruparam entre si e ficaram mais próximas de uma amostra de coronavírus de faisão.

Figura 5- Árvore filogenética para o gene 3.

Figura 6 - Árvore filogenética para o gene 5.

5 DISCUSSÃO

Segundo Cavanagh (2005) o número de relatos a respeito dos coronavírus em espécies aviárias tem aumentado drasticamente nos últimos anos e estes coronavírus encontrados geralmente pertencem ao grupo 03 dos coronavírus. O TCoV acomete perus em diferentes faixas etárias, podendo ocorrer uma morbidade de 100% e mortalidade que pode variar de 10% a 50% em aves jovens (CAVANAGH et al., 2001), como foi visto nas granjas aqui estudadas.

Este agente é descrito como um dos patógenos associados à PEMS que foi de grande importância nos EUA durante os anos 90 (GOODWIN et al., 1995; BARNES e GUY, 1997; BROWN et al., 1997; GUY et al., 2000; KOCI et al., 2000; SCHULTZ-CHERRY et al., 2000; YU et al., 2000). Outros vírus como o astrovírus, rotavírus e reovírus, muitas vezes podem estar associados ao TCoV acentuando a severidade do quadro entérico (BARNES e GUY, 2003).

A replicação do TCoV ocorre na porção apical da vilosidade intestinal, causando má absorção, dificuldade na digestão, diarreia e alteração na microbiota intestinal. (NAQI et al., 1971). Este agente já foi descrito no Canadá, Gran Bretanha, USA (DEA, 1986; GUY, 2003, CAVANAGH et al., 2001) e no Brasil (VILLARREAL et al., 2006) como agente etiológico de doenças entéricas apresentando um quadro similar ao descrito no presente trabalho.

TCoV foi detectado em lotes de perus de 10 a 104 dias que apresentavam diarreia severa, refugagem e aumento da mortalidade. Os sintomas presentes nas aves das quais as amostras foram colhidas são compatíveis com os descritos em perus (GUY, 2003), sugerindo que o TCoV teve participação na etiologia dos casos de enterite aqui descritos.

Na Tabela 3, pode-se observar que 82,76% das amostras foram positivas para a presença de coronavírus de perus utilizando-se o gene alvo 3'UTR, demonstrando que este agente está presente nos plantéis pesquisados, trazendo prejuízos à avicultura.

Cinco amostras que apresentavam algum tipo de sinal clínico (diarreia, prostração, aumento da mortalidade etc.) foram negativas; neste caso os sintomas podem ter sido causados por outro agente viral ou bacteriano, como por exemplo, astrovirus, rotavirus

sorogrupos A e D, *Escherichia coli* e *Salmonella* (QURESHI et al., 2000; VILLARREAL, et al., 2006).

Apesar de até hoje nada se conhecer a respeito da função dos genes 3 e 5, mantidos através da evolução, talvez estes possam estar relacionados com o tropismo do vírus e a patogenicidade dos mesmos. Lin et al., 2004 sugeriram que os genes 3 e 5 podem desempenhar um papel importante na patogênese com base na sequências altamente conservadas e na estrutura dos coronavírus aviários. Apesar de a proteína 3a ser descrita como uma proteína não estrutural, Ito e colaboradores reportaram que a proteína 3a do coronavírus da SARS, é incorporada às partículas da proteína S e interage na expressão desta proteína, considerando desta forma a proteína 3a como uma proteína estrutural (ITO et al., 2005). Neste trabalho não foi possível estabelecer nenhuma relação entre a patogenia e a detecção dos genes 3 e 5, pois amostras negativas para estes genes apresentaram sinais clínicos e lesões semelhantes às amostras positivas.

Das 24 amostras positivas para a região 3'UTR, 12 foram positivas para o gene 3 e 9 para o gene 5. Através destes resultados podemos sugerir que apesar de esta região ser considerada conservada entre os coronavírus aviário (CAVANAGH et al., 2001; CAVANAGH et al., 2002; LIN et al., 2004), pode haver uma pequena variabilidade genética que não permitiu que os primers desenhados para estas regiões sofressem hibridação com os RNAs das amostras.

Baseados nestes resultados pode-se concluir que a amplificação da região 3'UTR apresentou-se como uma acurada técnica para a detecção do TCoV. Já os genes 3 e 5 apesar de serem conservados apresentaram uma menor sensibilidade, isto pode ter ocorrido devido a região 3'UTR ter sido pesquisada por Nested_PCR ao passo que os genes 3 e 5 por PCR simples.

A ocorrência do TCoV encontrada neste trabalho é um alerta para as empresas avícolas, pois demonstra que o vírus está circulando em nosso país, sendo este um dos principais causadores da PEMS. Até hoje, não existe tratamento específico para este vírus, o que se utiliza são antibióticos que reduzem a mortalidade por controlar as infecções bacterianas secundárias (GUY, 2003); este fato faz com que os gastos com os tratamentos aumentem os custos de produção, resultando enormes prejuízos para a avicultura brasileira.

O sequenciamento do cDNA e a filogenia demonstraram que as amostras encontradas possuem grande similaridade entre elas, mas diferem das outras amostras de TCoV descritas no Genbank. Este fato indica que as amostras de TCoV brasileiras devem ter evoluído de maneira diferente em relação aos outros continentes. A análise das seqüências dos genes 3 e 5 revelaram que as amostras aqui estudadas possuem um padrão comum e isto sugere que são originárias de uma mesma história evolutiva, o que deve representar um padrão regional das amostras brasileiras e pode ter sido derivado da recombinação de eventos entre pelo menos 02 amostras ancestrais, uma mais próxima do IBV (para o gene 3) e outra mais próxima do PhCoV (para o gene 5). Esta característica evolutiva pode ser semelhante epidemiologicamente com o IBV. Estudos de epidemiologia molecular mostraram que as variantes ou sorotipos de IBV não foram espalhados de um lugar para outro e sim foram desenvolvendo –se separadamente (ZANELLA et al., 2003).

Os coronavírus das espécies IBV, TCoV e PhCoV são muito próximos em termos de sequencia dos genes e antigenicamente. Experimentos realizados com inoculação de TCoV e PhCoV em galinhas resultaram em replicação viral, sem causar a doença, porém estes experimentos foram realizados em laboratórios, no campo devido a outros fatores a consequência da infecção viral poderia ser exacerbada. Não podemos descartar a possibilidade de uma destas espécies de coronavírus causarem doença em outra espécie (CAVANAGH, 2005).

Os sinais apresentados pelas aves neste estudo são característicos de uma infecção por TCoV, mas a alta identidade das amostras com o IBV(gene 3) e PhCoV (gene 5) corroboram com os dados encontrados na literatura. Lin et al., 2002 estudou também os genes 5a e 5b e encontrou uma similaridade de nucleotídeos entre TCoV e IBV na ordem de 88, 4% a 91, 8% e em relação a identidade de aminoácidos este valor foi de 85, 4% a 94%. Lin et al., 2004 encontrou altos níveis de similaridade entre TCoV e IBV (82, 1-92%) para os genes 3, gene M, gene 5, e gene N, mas baixa similaridade para proteína S (33, 8-33, 9%). Loa et al., 2006 sugere que o TCoV tem a mesma origem do IBV e com a evolução adquiriu sequencias do gene S com tropismo para intestinos de perus. Cavanagh et al., 2002 demonstrou que a proteína S1 do IBV apresenta 80% de identidade de aminoácidos em relação a proteína S1 do PhCoV e Elena et al., 2007 encontrou 79% a 81% de identidade entre a proteína S1do TCoV e QCoV (coronavírus de codornas), estes dados nos levam a questionar a taxonomia dos coronavírus. Será que estes coronavírus são

espécies diferentes ou são membros de uma mesma espécie que se adaptam a diferentes hospedeiros aviários? Baseado nas diferenças encontradas na proteína S dos TCoV e IBV e em seus diferentes tropismo Cavanagh, 2005 considera que sejam 02 vírus distintos.

Um grupo novo de vírus causando a bronquite infecciosa foi identificado em aves comerciais na Austrália. Estes vírus possuíam características genotípicas diferentes dos coronavírus do grupo 03. Estes novos vírus encontrados não possuem a maioria dos genes não estruturais e possuem uma nova ORF (open reading frame), denominada de X1. A ordem dos genes encontrados foi: 5'Pol-S-X1-E-M-N-UTR-3' ou 5'-Pol-S-X1-E-M-5b-N-UTR-3'. Fenotipicamente estes vírus também se diferenciaram do IBV clássico, pois apresentaram um crescimento lento com baixos títulos *in vitro* e *in vivo* e foram menos imunogênicos nas aves, além disto, estes vírus não induziram lesões nos rins, comuns nas infecções por IBV (MARDANI et al., 2008).

Gomaa et al. (2008) mostrou que a identidade do gene S dos TCoV foi somente de 40% e 44% em relação ao grupo I e II dos coronavírus, respectivamente, enquanto que a similaridade com diferentes cepas de IBV foi de 57%. A completa sequência genômica do TCoV mostrou claramente que a estrutura genômica e as sequências do TCoV estão muito próximas do IBV.

No Brasil são poucas as informações sobre a PEMS em perus. O primeiro relato de PEMS em perus associando o coronavírus de perus e o astrovírus, causando alta mortalidade, depressão e baixo desenvolvimento foi feito por Villarreal et al., 2006. Em 2007 Teixeira et al. também relatou a presença do TCoV associado a PEMS no sudoeste do Brasil.

Maiores estudos a respeito dos genes do TCoV devem ser realizados para um maior conhecimento molecular destes vírus, mas este trabalho foi o pioneiro na descrição molecular do TCoV no Brasil, sendo os dados aqui apurados de extrema importância para epidemiologia molecular dos coronavírus que acometem os perus.

6 CONCLUSÕES

6.1 Presença do TCoV nos plantéis avícolas brasileiros.

6.2 A técnica de Nested-RT-PCR para amplificação da região 3' UTR é eficiente para a detecção do TCoV.

6.3 Os genes 3 e 5 não devem ser utilizados para a definição da espécie do coronavírus.

6.4 As amostras estudadas possuem grande similaridade entre si, um padrão comum e uma mesma história evolutiva.

6.5 As amostras brasileiras de TCoV estão mais próximas do IBV (gene 3) e do PhCoV (gene 5) do que das outras amostras de TCoV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AN, S.; CHEN, C. J.; YU, X.; LEIBOWITZ, J. L.; MAKINO, S. Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. **Journal of Virology**, v. 73, n. 9, p. 7853-7859, 1999.
- BARNES, H. J. Viral Enteric Infections. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, A. M. FADLY, J. R.; MCDOUGALD L. R.; SWAYNE D. E. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 10th ed. Ames: Iowa state University Press, 1997. p. 685-686.
- BARNES, H. J.; GUY, J. S. Poult enteritis-mortality syndrome (“spiking mortality”) of turkeys. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODA, H. W. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 10th ed. Ames: Iowa State Press, 1997. p. 1025-1031.
- BARNES, H. J.; GUY, J. S. Poult enteritis-mortality syndrome. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State Press, 2003. p. 320-326.
- BOS, E. C. W.; LUYTJES, W.; VAN DER MEULEN, H.; KOERTEN, H. K.; SPAAN, W. J. M. The production of recombinant infectious DI – particles of a murine coronavirus in the absence of helper virus. **Virology**, v. 218, p. 52-60. 1996.
- BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F.; HEINEMANN, M. B.; LIMA, C. H. A.; ROSALES, C. A. R.; RUIZ, V. L. A.; JEREZ, J. A. Animal coronavíruses. **Virus Reviews and Research**, v. 1, n. 6, p. 7-13, 2001.
- BREDENBEEK, P. J.; NOTEN, A. F.; HORZINEK, M. C.; SPAAN, W. J. Identification and stability of a 30-KDa nonstructural protein encoded by mRNA 2 of mouse hepatitis virus in infected cells. **Virology**, v. 175, p. 303-306, 1990.
- BRESLIN, J. J.; SMITH, L. G.; FULLER, F. J.; GUY, J. S. Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid gene and 3’ untranslated region identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. **Virus Research**, v. 65, p. 187-198. 1999.
- BROWN, P. T.; GARCIA A. P.; KELLEY, L. Spiking Mortality of turkey poults: 1. experimental reproduction in isolation in isolation facilities. **Avian Diseases**, v. 41, p. 604-609, 1997.
- CARVER, D. K.; VAILLANCOURT, J. P.; STRINGHAM, M.; GUY, J. S.; BARNES, H. J. Mortality patterns associated with poult enteritis mortality syndrome (PEMS) and coronaviral enteritis in turkey flocks raised in PEMS-affected regions. **Avian Diseases**, v. 45, p. 985-991, 2001.

* De acordo com:

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

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHARMA, M.; DRURY, S. E.; AINSWORTH, H. L.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Detection of a coronavirus from turkey poult in Europe genetically relates to infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Pathology**, v. 30, p. 365-378, 2001.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D. de B.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to Coronaviruses of domestic fowl (Infectious Bronchitis Virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, p. 81-93, 2002.

CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, v. 34, p. 439-448, 2005.

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.; ROGERS, D. B.; HOLMES, K. V.; FERTSCH, D.; REMENICK, J.; MCGOWAN, J. J. In vitro replication of mouse hepatitis virus strain A59. **Journal of Virology**, v. 61, n. 6, p. 1814-1820, 1987.

DEA, S.; MARSOLAIS, G.; BEAUBIEN, J.; RUPPANNER, R. Coronaviruses associated with outbreaks of transmissible enteritis of turkey in Quebec: Hemagglutination properties and cell cultivation. **Avian Diseases**, v. 30, p. 319-326, 1986.

DEA, S.; VERBEEK, A. J.; TIJSSEN, P. Antigenic and genomic relationships among turkey and bovine enteric coronaviruses. **Journal Virology**, v. 64, p. 3112-3118, 1990.

De HAAN, C. A.; KUO, L.; MASTERS, P. S.; VENNEMA, H.; ROTTIER, P. J. Coronavirus particle assembly: primary structure requirements of the membrane protein. **Journal of Virology**, v. 72, n. 8, p. 6838-6850, 1998.

DE HAAN, C. A.; MASTERS, P. S.; SHEN, X.; WEISS, S.; ROTTIER, P. J. The group-specific murine coronavirus genes are not essential, but their deletion, by reverse genetics, is attenuating in the natural host. **Virology**, v. 296, p. 177-189, 2002.

FISCHER, F.; PENG, D.; 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.

GOMAA, M. H.; BARTA, J. R.; OJKIC, D.; YOO, D. Complete genomic sequence of turkey coronavirus. **Virus Research**, v. 135, p. 237-246, 2008.

GOODWIN, M. A.; BROWN, J.; PLAYER, E. C.; STEFFENS, W. L.; HERMES, D.; DEKICH, M. A. Fringed membranous particles and viruses in faeces from healthy turkey poult and from poult with putative poult enteritis complex/spiking mortality. **Avian Pathology**, v. 24, p. 497-505, 1995.

GUY, J. S.; BARNES, J.; SMITH, L. G.; BRESLIN, J. Antigenic characterization of a turkey coronavirus identified in poult enteritis and mortality syndrome affected turkeys. **Avian Pathology**, v. 29, p. 207-212, 2000.

GUY, J. S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 77, p. 1166-1175, 1998.

GUY, J. S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to human coronavirus: a review. **Avian Diseases**, v. 41, p. 583-590, 1997.

GUY, J. S. Turkey coronavirus enteritis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGLD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 11th ed. Ames: Iowa State Press, 2003. p. 300-307.

GUY, J. S. Turkey Coronavirus Enteritis. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 12th ed. Ames: Iowa State Press, 2008. p. 330-338.

HERREWEGH, A. A.; VENNEMA, H.; HORZINEK, M. C.; ROTTIER, P. J.; DE GROOT, R. J. The molecular genetics of feline coronaviruses: comparative sequence analysis of the ORF 7a/7b transcription unit of different biotypes. **Virology**, v. 212, p. 622-631, 1995.

HISCOX, J. A.; WURM, T.; WILSON, L.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D.; BROOKS, G. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localizes to the nucleolus. **Journal of Virology**, v. 75, n. 1, p. 506-512, 2001.

HODGSON, T.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Neither the RNA nor proteins of open reading frames 3a and 3b of the coronavirus infectious bronchitis virus are essential for replication. **Journal Virology**, v. 80, n. 1, p. 296-305, 2006.

ITO, N.; MOSSEL, E. C.; NARAYANAN, K.; POPOV, V. L.; HUANG, C.; INOUE, T.; PETERSC, J.; MAKINO, S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a protein is a viral structural protein. **Journal of Virology**, v. 79, p. 3182-3186, 2005.

JIA, W.; NAQI, S. A. Sequence analysis of gene 3, gene 4 and gene 5 of avian infectious bronchitis virus strain CU-T2. **Gene**, v. 189, p. 189-193, 1997.

KOCI, M. D.; SEAL, B. S.; SCHULTZ-CHERRY, S. Molecular characterization of an avian astrovirus. **Journal of Virology**, v. 74, p. 6173-6177, 2000.

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

LAPPS, W.; HOGUE, B. G.; BRIAN, D. A. Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes. **Virology**, v. 157, n. 1, p. 47-57, 1987.

LIN, T. L.; LOA, C. C.; WU, C. C. Complete sequences of 3' end coding region for structural protein genes of turkey coronavirus. **Virus Research**, v. 106, p. 61-70, 2004.

LOA, C. C.; LIN T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; HOOPER T. A.; SCHRADER D. L. Differential detection of turkey coronavirus, infectious bronchitis virus, and bovine coronavirus by a multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Virological Methods**, v. 131, p. 86-91, 2006.

NATURE. **Desenho esquemático do coronavírus**. Disponível em: <http://www.nature.com/nri/journal/v5/n12/full/nri1732.html>. Acesso em: 15 maio 2009.

POMEROY, B. S.; NAGARAJA, K. V. Coronaviral enteritis of turkeys (bluecomb disease). In: CALNEK, B. W.; BARNES, J.; BEARD, C. W.; REID, W. M.; YODER, H. W. **Diseases of Poultry**. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991.

QURESHI, M. A.; YU, M.; SAIF, Y. M. A novel "small round virus" inducing poult enteritis and mortality syndrome and associated immune alterations. **Avian Diseases**, v. 44, p. 275-283, 2000.

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.

SCHULTZ, 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.

SCHULTZ-CHERRY, S.; KAPCZYNSKI, D. R.; SIMMONS, V. M.; KOCI, M. D.; BROWN, C.; BARNES, H. J. Identifying agent(s) associated with poult enteritis mortality syndrome: importance of the thymus. **Avian Diseases**, v. 44, p. 256-265, 2000.

SENANAYAKE, S. D.; BRIAN, D. A. Bovine coronavirus I protein follows ribosomal scanning on the bicistronic N mRNA. **Virus Research**, v. 48, n. 1, p. 101-105, 1997.

SHEN, S.; WEN, Z. L.; LIU, D. X. Emergence of a coronavirus infectious bronchitis virus mutant with a truncated 3b gene: functional characterization of the 3b protein in pathogenesis and replication. **Virology**, v. 311, p. 16-27, 2003.

SPAAN, W.; DELIUS, H.; SKINNER, M.; ARMSTRONG, J.; ROTTIER, P.; SMOEKENS, S.; VAN DER ZEIJST, B. A.; SIDDELL, S. G. Coronavirus mRNA synthesis involves fusion of non-contiguous sequences. **The EMBO Journal**, v. 2, n. 10, p. 1839-1844, 1983.

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

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual 2007/2008**. Disponível em: <www.uba.org.br/uba_rel08_internet.pdf>. Acesso em: 15 maio 2008.

VENNEMA, H.; GODEKE, G. J.; ROSSEN, J. W. A.; VOORHOUT, W. F.; HORZINEK, M. C.; OPSTELTEN, D. J. E.; ROTTIER, P. J. M. Nucleocapsid independent assembly of coronavirus-like particles by co-expression of viral envelope protein genes. **The EMBO Journal**, v. 15, p. 2020-2028, 1996.

VELAYUDHAN, B. T.; SHIN, H. J.; LOPES, V. C.; HOOPER, T.; HALVORSON, D. A.; NAGARAJAK, V. A reverse transcriptase – polymerase chain reaction assay for the diagnosis of turkey coronavirus infection. **Journal Veterinary Diagnostic Invest**, v. 15, p. 592-596, 2003.

VILLARREAL, L. Y. B.; ASSAYAG, M. S.; BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L. V.; BUNGER, A. N. D.; FERREIRA, C. S. A.; GOMES, C. R.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Identification of turkey astrovirus and turkey coronavirus in an outbreak of poultry enteritis and mortality syndrome. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 8, p. 131-135, 2006.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635-664, 2005.

WESLEY, R. D.; WOODS, R. D.; CHEUNG, A. K. Genetic basis for the pathogenesis of transmissible gastroenteritis virus. **Journal Virology**, v. 64, p. 4761-4766, 1990.

YU, M.; ISMAIL, M. M.; QURESHI, M. A.; DEARTH, R. N.; BARNES, H. J.; SAIF, Y. M. Viral agents associated with poult enteritis and mortality syndrome : the role of a small round virus and a turkey coronavirus. **Avian Diseases**, v. 44, p. 297-304, 2000.

ZANELLA, A.; LAVAZZA, A.; MARCHI, R.; MARTIN, A. M.; PAGANELLI F. Avian infectious bronchitis: characterization of new isolates from Italy. **Avian Diseases**, v. 47, p. 180-185, 2003.

ANEXO A - TABELAS

Tabela A.1 - Identidade dos nucleotídeos do gene 3 dos coronavírus de perus (TCoV) brasileiros comparados com o gene 3 do IBV, PhCoV and TCoV de diferentes regiões.

[illegible]

Tabela A.2. Identidade dos nucleotídeos do gene 5 dos coronavírus de perus Brasileiros(TCoV) comparados com o gene 5 de outras sequencias de coronavírus.

Número de acesso do GenBank de diversos coronavirus e dos isolados no Brasil		Número de acesso de outros coronavirus em comparação com os isolados no Brasil.														Amostras isoladas no Brasil				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	AJ310641.TCoV	ID	0.894	0.888	0.923	0.942	0.942	0.904	0.913	0.878	0.884	0.932	0.923	0.932	0.913	0.875	0.849	0.849	0.853	0.849
2	AY839141.IBV		ID	0.955	0.900	0.904	0.904	0.955	0.910	0.894	0.952	0.904	0.910	0.91	0.891	0.865	0.840	0.840	0.843	0.840
3	AY839136.IBV			ID	0.907	0.913	0.913	0.952	0.913	0.888	0.961	0.910	0.913	0.897	0.9	0.878	0.853	0.853	0.856	0.853
4	AY839142.IBV				ID	0.955	0.955	0.904	0.948	0.894	0.904	0.955	0.984	0.955	0.971	0.904	0.878	0.878	0.881	0.878
5	AY856346.IBV					ID	1.000	0.920	0.942	0.900	0.907	0.945	0.955	0.952	0.945	0.897	0.872	0.872	0.875	0.872
6	AY842860.IBV						ID	0.920	0.942	0.900	0.907	0.945	0.955	0.952	0.945	0.897	0.872	0.872	0.875	0.872
7	AY842863.IBV							ID	0.913	0.891	0.955	0.907	0.910	0.904	0.894	0.872	0.846	0.846	0.849	0.846
8	DQ007017.IBV								ID	0.926	0.913	0.948	0.945	0.942	0.932	0.904	0.878	0.878	0.881	0.878
9	AY839139.IBV								ID	0.884	0.900	0.897	0.897	0.878	0.878	0.869	0.843	0.843	0.846	0.843
10	AY702975.IBV									ID	0.907	0.907	0.91	0.894	0.894	0.872	0.846	0.846	0.849	0.846
11	AJ311362.IBV										ID	0.955	0.948	0.939	0.939	0.910	0.884	0.884	0.888	0.884
12	AF470626.IBV											ID	0.952	0.968	0.968	0.904	0.878	0.878	0.881	0.878
13	NC010800.TCoV												ID	0.939	0.939	0.904	0.878	0.878	0.881	0.878
14	EU022526.TCoV														ID	0.891	0.865	0.865	0.869	0.865
15	USP176.TCoV															ID	0.974	0.974	0.977	0.974
16	USP23.TCoV																ID	0.993	0.996	0.993
17	USPB.TCoV																	ID	0.996	1.000
18	USP174.TCoV																		ID	0.996
19	USPNpo6.TCoV																			ID

(continua)

Tabela A.2 (continuação)

Número de acesso do GenBank de diversos coronavírus e dos isolados no Brasil		Número de acesso de outros coronavírus em comparação com os isolados no Brasil.														Amostras isoladas no Brasil.				
		1																		
		20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
20	AF469013.IBV	ID	0.958	0.894	0.968	0.955	0.958	0.958	0.955	0.958	0.936	0.955	0.958	0.939	0.958	0.907	0.881	0.881	0.884	0.881
21	AY846837.IBV		ID	0.897	0.955	0.942	0.945	0.952	0.948	1.000	0.900	0.948	0.929	0.904	0.952	0.897	0.872	0.872	0.875	0.872
22	AJ619604.PhCoV			ID	0.884	0.869	0.894	0.894	0.891	0.897	0.859	0.910	0.872	0.862	0.9	0.875	0.856	0.849	0.853	0.849
23	AF469014.IBV				ID	0.948	0.945	0.945	0.942	0.955	0.913	0.948	0.936	0.913	0.952	0.91	0.884	0.884	0.888	0.884
24	AY702085.IBV					ID	0.942	0.942	0.939	0.942	0.900	0.936	0.926	0.9	0.939	0.888	0.862	0.862	0.865	0.862
25	NC_001451.IBV						ID	0.993	0.996	0.945	0.907	0.945	0.923	0.91	0.948	0.91	0.884	0.884	0.888	0.884
26	DQ001339.IBV							ID	0.996	0.952	0.907	0.948	0.923	0.91	0.952	0.91	0.884	0.884	0.888	0.884
27	DQ001338.IBV								ID	0.948	0.904	0.945	0.920	0.907	0.948	0.907	0.881	0.881	0.884	0.881
28	AY641576.IBV									ID	0.900	0.948	0.929	0.904	0.952	0.897	0.872	0.872	0.875	0.872
29	AF072913.TCoV										ID	0.900	0.907	0.977	0.9	0.865	0.876	0.876	0.879	0.876
30	AF072912.TCoV											ID	0.923	0.904	0.99	0.904	0.878	0.878	0.881	0.878
31	AF072911.TCoV												ID	0.91	0.926	0.875	0.849	0.849	0.853	0.849
32	EU022525.TCoV													ID	0.904	0.869	0.861	0.861	0.864	0.861
33	EU095850.TCoV														ID	0.904	0.878	0.878	0.881	0.878
34	USP176.TCoV															ID	0.974	0.974	0.977	0.974
35	USP23.TCoV																ID	0.993	0.996	0.993
36	USPB.TCoV																	ID	0.996	1
37	USP174.TCoV																		ID	0.996
38	USPNpo6.TCoV																			ID

(conclusão)