



Genealogia de Amostras Brasileiras de Coronavírus Bovino

ADELINE DE MIRA FERNANDES

**São Paulo
2016**

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

Genealogia de Amostras Brasileiras de Coronavírus Bovino

ADELINE DE MIRA FERNANDES

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Orientadora: Dra. Edviges Maristela Pituco

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo
Núcleo de Informação e Documentação – IB

Fernandes, Adeline de Mira.

Genealogia de Amostras Brasileiras de Coronavírus Bovino. / Adeline de Mira
Fernandes. – São Paulo, 2016.
70 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-
Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.
Linha de pesquisa: Gestão Sanitária e Ambiental na Produção Animal.

Orientador: Edviges Maristela Pituco.

Versão do título para o inglês: Genealogy of Brazilian Samples of Bovine
Coronavirus.

1. Bovinos 2. Diarreia 3. Semi-nested RT-PCR 4. Gene N 5. Sequenciamento
I. Fernandes, Adeline de Mira II. Pituco, Edviges Maristela III. Instituto Biológico
(São Paulo). IV. Título

IB/Bibl./2016/06



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

Pós-Graduação
Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
secretariapg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: ADELINA DE MIRA FERNANDES

Título: Genealogia de Amostras Brasileiras de Coronavírus Bovino

Orientadora: Dra. Edviges Maristela Pituco

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Segurança no Agroecossistema.

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Edviges Maristela Pituco

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. Dr.Fábio Gregori

Instituição:FMVZ-USP

Assinatura:

Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão

Instituição: FMVZ-USP

AGRADECIMENTOS

A **Deus** por estar comigo, me amparando e me abençoando todos os segundos do meu dia.

Aos meus **pais e família**, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof. Dra. **Edviges Maristela Pituco**, pelos ensinamentos e pela oportunidade e confiança depositada em mim durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **Paulo Eduardo Brandão**, membro da banca examinadora, por toda colaboração para a realização deste trabalho, pela paciência e pelos ensinamentos dados desde o período da graduação, e pela gentileza e disposição em sempre me ajudar.

Ao Prof. Dr. **Fábio Gregori**, membro da banca examinadora, pela participação, sugestões e pelas valiosas contribuições dadas.

À Profa. Dra. **Cláudia Del Fava**, membro suplente da banca, por todas as sugestões e conselhos.

À Prof. Dra. **Liria Hiromi Okuda**, membro suplente da banca, pelos ensinamentos e pelo auxílio sempre quando precisei.

A **Michele Lima**, obrigado por toda ajuda, orientações e conselhos mesmo de longe, pela amizade, companhia e pelos momentos de descontração e pelas boas risadas.

A **Vivian Cardoso**, pela amizade dentro e fora do laboratório, pela companhia, por compartilhar as frustrações e os bons momentos, pelos momentos divertidos e por todo o apoio.

Ao **Allan Alvarenga**, agradeço pela amizade, companheirismo, pelas caronas até Campinas, as conversas engraçadíssimas e momentos de descontração, pela disposição em me ajudar com o trabalho.

A **Maira de Souza**, por toda ajuda com a biologia molecular e por me socorrer em vários momentos, pela amizade, companheirismo, pelas conversas e momentos divertidos.

A **Thaís Garcia**, obrigado pela amizade, companhia, pelas conversas e boas risadas.

A **Larissa** agradeço pela amizade, companheirismo, pelos momentos divertidos dentro e fora do laboratório

À **Marta Elisabete Scarelli Vicente** , pelas conversas agradáveis e por toda a disponibilidade em me ajudar.

A **Simone Fabris**, por toda ajuda com o isolamento celular, pelas conversas e boas risadas.

Às pesquisadoras do LVB **Eliana De Stefano e Adriana Hellmeister de Campos Nogueira** pelas contribuições diretas e indiretas neste trabalho.

A **todos os funcionários** do laboratório de viroses de bovídeos do Instituto Biológico

A **todos professores** do curso de pós-graduação do Instituto Biológico

A **CAPES**, por ter concedido a bolsa

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

FERNANDES, A.M. GENEALOGIA DE AMOSTRAS BRASILEIRAS DE CORONAVÍRUS BOVINO. São Paulo – SP. 2016. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Os coronavírus constituem-se em um dos principais agentes etiológicos de gastroenterites em bezerros, ocasionando prejuízos econômicos significativos à pecuária. Considerando que para o delineamento de medidas profiláticas é necessária a compreensão do padrão de circulação e evolução deste vírus, o presente trabalho teve como objetivos: otimizar e validar protocolos de PCR convencional; avaliar a sensibilidade das técnicas de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR na detecção de coronavírus em bezerros e verificar a existência de marcadores moleculares através dos genes S, HE e N e relacioná-los a padrões filogeográficos. Para tanto foram avaliadas 114 amostras fecais de bezerros de corte e de leite, com ou sem sintomas provenientes de cinco Estados brasileiros (São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Mato Grosso e Bahia). As reações validadas de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR dirigida ao gene N demonstraram uma sensibilidade analítica de 10^{-7} e 10^{-3} para as diluições do vírus padrão (HA: 256) em suspensão fecal a 20% e PBS respectivamente. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR, sendo que a reação de *semi-nested* RT-PCR mostrou ser mais sensível no diagnóstico de BCoV. Das 114 amostras entéricas analisadas, verificou-se uma frequência de 14,91% e 56,25% para as amostras individuais e propriedades rurais, respectivamente. Identificou-se o BCoV em bezerros provenientes de propriedades rurais situadas nos Estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Bahia e Mato Grosso. A positividade foi detectada em animais assintomáticos e com manifestações clínicas no sistema gastrointestinal. A infecção foi observada em animais com idade variando de 1 a 15 meses. A proporção de rebanhos bovinos de leite infectados foi de 12,22% (4/33), e de corte o percentual de positividade foi de 22,45% (9/40). A genealogia obtida pela árvore de máxima verossimilhança para o gene N, demonstrou que não houve diferenciação entre linhagens de BCoV provenientes de bezerros e animais adultos. As sequências brasileiras de BCoV para o gene codificador da proteína N segregaram em 2 *cluster* distintos, sendo que as amostras deste estudo foram estreitamente relacionadas a amostras asiáticas. Estes resultados contribuem para caracterização molecular do gene N dos BCOVs e demonstram que esta espécie viral está disseminada nos rebanhos bovinos brasileiros.

Palavras-chave: Bovinos; Diarreia; *semi-Nested* RT-PCR; Gene N; Sequenciamento

ABSTRACT

FERNANDES, A.M. GENEALOGY OF BRAZILIAN SAMPLES OF BOVINE CORONAVIRUS. São Paulo – SP. 2016. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

Coronaviruses constitute one of the main etiologic agents of gastroenteritis in calves, causing significant economic losses to livestock. Whereas for the design of preventive measures is needed to understand the circulation pattern and evolution of this virus, this study aimed to: optimize and validate conventional PCR protocols; evaluate the sensitivity of RT-PCR and semi-*nested* RT-PCR in coronavirus detection in calves and verify the existence of molecular markers through the genes S, N and HE and relate them to phylogeographic patterns. Therefore, we evaluated 114 stool samples of beef and dairy calves, with or without symptoms from five Brazilian states (São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Mato Grosso and Bahia). The reactions validated RT-PCR and semi-*nested* RT-PCR directed to the N gene demonstrated an analytical sensitivity of 10^{-7} and 10^{-3} dilutions of the standard virus (HA:256) in 20% fecal suspension and PBS respectively. There was a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the RT-PCR and semi-*nested* RT-PCR, and the reaction semi-*nested* RT-PCR was more sensitive in the diagnosis BCoV. Of the 114 stool samples from analyzed there was a frequency of 14.91% and 56.25% for the individual samples and farms, respectively. It identified the BCoV in calves from farms located in the states of São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais, Bahia and Mato Grosso. Positivity was detected in asymptomatic animals and clinical manifestations in the gastrointestinal system. The infection was observed in animals ranging in age from 1 to 15 months. The proportion of infected dairy cattle herds was 12.22% (4/33), and cutting the percentage of positivity was 22.45% (9/40). The genealogy obtained by maximum likelihood tree for the N gene, showed no differentiation between BCoV strains from calves and adult animals. Brazilian BCoV sequences for the gene encoding the protein N segregated into 2 distinct cluster, while the samples of this study were closely related to Asian samples. These results contribute to molecular characterization of the N gene of BCoVs and show that this viral species is widespread in Brazilian cattle.

Key-words: Cattle; Diarrhea; semi-*nested* RT -PCR; N Gen; Sequencing

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ELETROMICROGRAFIA DE PARTÍCULAS DE CORONAVÍRUS.	4
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VÍRION E DA GLICOPROTEÍNA S	6
FIGURA 3: ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DOS CORONAVÍRUS.	7
FIGURA 4: ESQUEMA GERAL ILUSTRANDO O CICLO DE REPLICAÇÃO DOS CORONAVÍRUS.	9
FIGURA 5: LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS POR MUNICÍPIOS DO ESTADO DE SÃO PAULO, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 2008 A DEZEMBRO DE 2015.	18
FIGURA 6: LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS POR MUNICÍPIOS DO ESTADO DE MINÁS GERAIS, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 2008 A DEZEMBRO DE 2015.	19
FIGURA 7: LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS POR MUNICÍPIO DO ESTADO DE SANTA CATARINA, NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2014.	19
FIGURA 8: LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS POR MUNICÍPIOS DO ESTADO DA BAHIA, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 2008 A DEZEMBRO DE 2015.	20
FIGURA 9: LOCALIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ANALISADAS POR MUNICÍPIO DO ESTADO DO MATO GROSSO, NO PERÍODO DE NOVEMBRO DE 2008 A DEZEMBRO DE 2015.	20
FIGURA 10: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS REGIÕES AMPLIFICADAS PELA RT-PCR GENE S	27
FIGURA 11: GEL DE AGAROSE A 1.5% CORADO COM GELRED®(1:150) DEMOSTRANDO O FRAGMENTO ESPERADO DE 306 PB. COLUNA L: PADRÃO DE PESO MOLECULAR (<i>LADDER</i> 100 PB); COLUNA 1: AMOSTRA FECAL; COLUNA 2: AMOSTRA FECAL; COLUNA 3 E 8: CONTROLE PADRÃO; COLUNA 4 E 9: CONTROLE NEGATIVO. COLUNAS 1 A 5: PRIMEIRA AMPLIFICAÇÃO (RT-PCR) E COLUNAS 6 A 10: SEGUNDA AMPLIFICAÇÃO (<i>SEMI-NESTED</i>).	32
FIGURA 12: GRADIENTES DE TEMPERATURA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA DA RT-PCR DIRIGIDA AO GENE N EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1,5%. L: PESO DE 100 PB; COLUNAS 1-2: 45°C; COLUNAS 3-4: 50°C; COLUNAS 5-6: 55°C; COLUNAS 7-8: 60°C	33
FIGURA 13: GRADIENTES DE TEMPERATURA DE HIDRIDIZAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> BCOV1 +BCOV2 DIRIGIDA AO GENE N EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1.5%. L: PESO DE 100 PB; COLUNA 1: 50°C; COLUNA 2: 50,2°C; COLUNA 3: 50,7°C; COLUNA 4: 51,6°C; COLUNA 5: 52,7°C; COLUNA 6: 54,0°C; COLUNA 7: 55,4°C; COLUNA 8: 56,8°C; COLUNA 9: 58,1°C; COLUNA 10: 59,2°C; COLUNA 11: 60°C; COLUNA 12: 60,4°C.	34

- FIGURA 14: GRADIENTES DE TEMPERATURA DE HIDRIDIZAÇÃO DOS *PRIMERS* BCOV1 +BCOV3 DIRIGIDA AO GENE N EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1.5%. L: PESO DE 100 PB; COLUNA 1: 50°C; COLUNA 2: 50,2°C; COLUNA 3: 50,7°C; COLUNA 4: 51,6°C; COLUNA 5: 52,7°C; COLUNA 6: 54,0°C; COLUNA 7: 55,4°C; COLUNA 8: 56,8°C; COLUNA 9: 58,1°C; COLUNA 10: 59,2°C; COLUNA 11: 60°C; COLUNA 12: 60,4°C 34
- FIGURA 15: LIMIAR DE DETECÇÃO EM SUSPENSÃO FECAL A 20% DA RT-PCR DIRIGIDA AO GENE N EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1.5%. L: PESO DE 100 PB; COLUNA 1: 10^{-9} ; COLUNA 2: 10^{-8} ; COLUNA 3: 10^{-7} ; COLUNA 4: 10^{-6} ; COLUNA 5: 10^{-5} ; COLUNA 6: 10^{-4} ; COLUNA 7: 10^{-3} ; COLUNA 8: 10^{-2} ; COLUNA 9: 10^{-1} ; COLUNA 10: 10^0 ; COLUNA 11: CONTROLE NEGATIVO. 35
- FIGURA 16: LIMIAR DE DETECÇÃO EM PBS DA RT-PCR DIRIGIDA AO GENE N EM ELETROFORESE EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1.5%. L: PESO DE 100 PB; COLUNA 1: 10^{-9} ; COLUNA 2: 10^{-8} ; COLUNA 3: 10^{-7} ; COLUNA 4: 10^{-6} ; COLUNA 5: 10^{-5} ; COLUNA 6: 10^{-4} ; COLUNA 7: 10^{-3} ; COLUNA 8: 10^{-2} ; COLUNA 9: 10^{-1} ; COLUNA 10: 10^0 ; COLUNA 11: CONTROLE NEGATIVO. 36
- FIGURA 17: LIMIAR DE DETECÇÃO EM SUSPENSÃO FECAL A 20% DA SEMI-NESTED RT-PCR DIRIGIDA AO GENE N EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1.5%. L: PESO DE 100 PB; COLUNA 1: 10^{-9} ; COLUNA 2: 10^{-8} ; COLUNA 3: 10^{-7} ; COLUNA 4: 10^{-6} ; COLUNA 5: 10^{-5} ; COLUNA 6: 10^{-4} ; COLUNA 7: 10^{-3} ; COLUNA 8: 10^{-2} ; COLUNA 9: 10^{-1} ; COLUNA 10: 10^0 ; COLUNA 11: CONTROLE NEGATIVO 36
- FIGURA 18: LIMIAR DE DETECÇÃO EM PBS DA SEMI-NESTED RT-PCR DIRIGIDA AO GENE N EM ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1.5%. L: PESO DE 100 PB; COLUNA 1: 10^0 ; COLUNA 2: 10^{-1} ; COLUNA 3: 10^{-2} ; COLUNA 4: 10^{-2} ; COLUNA 5: 10^{-4} ; COLUNA 6: 10^{-5} ; COLUNA 7: 10^{-6} ; COLUNA 8: 10^{-7} ; COLUNA 9: 10^{-8} ; COLUNA 10: 10^{-9} ; COLUNA 11: CONTROLE NEGATIVO 36
- FIGURA 19: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1,5% CORADO COM GELRED®(1:150) MOSTRANDO O FRAGMENTO ESPERADO DE 306 PB NOS RESULTADOS DA SEMI-NESTED PCR PARA O GENE N. 37
- FIGURA 20: ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 1,5% CORADO COM GELRED®(1:150) MOSTRANDO O FRAGMENTO ESPERADO DE 488 PB NOS RESULTADOS DA NESTED RT-PCR PARA O GENE S. 40
- FIGURA 21: ALINHAMENTO DE UM SEGMENTO DE 256 PB DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA N, TENDO COMO A AMOSTRA MEBUS DE BCOV COMO REFERÊNCIA. 45
- FIGURA 22: ALINHAMENTO DE UM SEGMENTO DE 76 AMINOÁCIDOS DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA N, TENDO A AMOSTRA MEBUS DE BCOV COMO REFERÊNCIA. 47
- FIGURA 23: ÁRVORE GENEALÓGICA NÃO ENRAIZADA CONSTRUÍDA PELO CRITÉRIO DE MÁXIMA VEROSSIMILHANÇA, MODELO EVOLUTIVO JUKES-CANTOR PARA SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA N. 49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PORCENTAGEM DE ANIMAIS POSITIVOS DE ACORDO COM A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.	38
TABELA 2: DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA BCOV POR ESTADOS E MUNICÍPIOS BRASILEIROS.	38
TABELA 3: DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA BCOV DE ACORDO COM A FAIXA ETÁRIA	39
TABELA 4: FREQUÊNCIA DE POSITIVIDADE DE BCOV EM RELAÇÃO AO SEXO E AOS SISTEMAS DE CRIAÇÃO E EXPLORAÇÃO	39
TABELA 5: COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE SEMI-NESTED RT-PCR NA DETECÇÃO DE BCOV	40
TABELA 6: PERCENTUAL DE IDENTIDADE ENTRE BCOV COM BASE NA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE N	45

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: CORONAVÍRUS: GÊNEROS, ESPÉCIES VIRAIS E HOSPEDEIROS NATURAIS	3
QUADRO 2: CORONAVÍRUS E SEUS RECEPTORES	6
QUADRO 3: ANIMAIS SILVESTRES E DOMÉSTICOS QUE ATUAM COMO RESERVATÓRIOS PARA BCOV E SUA DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	11
QUADRO 4: <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DO GENE N DO BCOV	22
QUADRO 5: GRADIENTES DE TEMPERATURAS DE HIBRIDIZAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i> BCOV1+ BCOV2 E BCOV1+ BCOV3	24
QUADRO 6: CONCENTRAÇÕES DE <i>PRIMERS</i> SENSO (BCOV1) E ANTI-SENSO (BCOV2+BCOV3)	25
QUADRO 7: <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DO GENE S1 DO BCOV	26
QUADRO 8: <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DO GENE S DO BCOV	27
QUADRO 9: <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A DETECÇÃO DO GENE HE DO BCOV	28
QUADRO 10: SEQUÊNCIAS DE BCOV COM BASE NO CODIFICADOR DO GENE N E DE CORONAVÍRUS BUBALINO RECUPERADAS DO <i>GENBANK</i> , SEGUNDO O NÚMERO DE ACESSO, IDENTIFICAÇÃO, PAÍS DE ORIGEM, HOSPEDEIRO, TIPO DE AMOSTRAE O ANO DE REALIZAÇÃO DO SEQUENCIAMENTO	31
QUADRO 11: RESULTADOS DA RT-PCR PARA OS 7 PARES DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO COMPLETA DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA S	41
QUADRO 12: AMOSTRAS POSITIVAS PARA BCOV PARA OS GENE N E S SUBMETIDAS AO SEQUENCIAMENTO DE DNA	42

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: RESULTADO DAS REAÇÕES DE PCR PARA OS GENE N, S E HE DE ACORDO COM A IDADE, SEXO, SISTEMAS DE CRIAÇÃO E EXPLORAÇÃO E A OCORRÊNCIA DE DIARREIA	65
ANEXO B: CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

'= minuto de hora

%= por cento

°C= graus Celsius

BLASTn= *Basic local alignment Search tool*

BCoV= Coronavírus bovino

c-DNA= DNA complementar

DNA= Ácido desoxirribonucleico

dNTP= deoxinucleosídeo trifosfato

DPEC= dietilpirocarbonato

HCoV= Coronavírus humano

IBV= Vírus da bronquite infecciosa das aves

ICTV= *International Committee on taxonomy of Viruses*

kDa= quiloDalton

kB= quilobases

MEM= Meio essencial mínimo

MERS= Síndrome respiratória do oriente médio

MHV= Virus da hepatite murina

mRNA= RNA mensageiro

mM= milimolar

ng= nanogramas

ORF= *Open Reading Frame*

pb= pares de bases

PBS= Tampão fosfato-salino

PCR= Reação em cadeia pela polimerase

pmol= picomoles

RNA= Ácido ribonucleico

RT= transcrição reversa

SARS= Síndrome respiratória aguda grave

TGEV= vírus da gastroenterite transmissível

μ l= microlitros

μ g= microgramas

U= unidades

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. HISTÓRICO	2
2.2 ETIOLOGIA	2
2.3 PATOGÊNSE E SINTOMATOLOGIA	9
2.4 TRANSMISSÃO E HOSPEDEIROS	10
2.5. EPIDEMIOLOGIA	11
2.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E EVOLUÇÃO	13
2.7 DIAGNÓSTICO	14
2.8 CONTROLE E PROFILAXIA	16
3. OBJETIVOS	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 AMOSTRAGEM	18
4.2 AMOSTRA DE REFERÊNCIA	21
4.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES FECAIS	21
4.4 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL	21
4.5 PESQUISA DE BCoV ATRAVÉS DE UMA SEMI-NESTED RT-PCR DIRIGIDA AO GENE N	22
4.5.1 Aplicação de uma semi- <i>nested</i> RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína N de acordo com protocolo descrito por Asano et al., 2010	22
4.5.2 Otimização e Validação de uma semi- <i>nested</i> RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína N	23
4.5.2.1 Contaminação experimental e a avaliação da sensibilidade analítica	23
4.5.2.2 Aplicação de uma semi- <i>nested</i> RT-PCR dirigida ao gene N	23
4.6 APLICAÇÃO DE UMA NESTED RT-PCR DIRIGIDA A AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S	25
4.7 APLICAÇÃO DE UMA RT-PCR DIRIGIDA AO GENE S COMPLETO	26

4.10 APLICAÇÃO DE UMA HEMI- <i>NESTED</i> RT-PCR DIRIGIDA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HE	28
4.11 SEQUENCIAMENTO DE DNA	29
4.11 ANÁLISE GENEALÓGICA	30
4.12 ANÁLISE DOS DADOS	31
5. RESULTADOS	32
5.1 APLICAÇÃO DE UMA SEMI- <i>NESTED</i> RT-PCR DIRIGIDA AO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA N DE ACORDO COM O PROTOCOLO DESCRITO POR ASANO et al., 2010	32
5.2 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA SEMI- <i>NESTED</i> PCR DIRIGIDA AO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA N	33
5.2.1 Determinação das temperaturas ótimas de transcrição reversa	33
5.2.2 Determinação das temperaturas ótimas de hibridização	33
5.2.3 Sensibilidade analítica da semi- <i>nested</i> RT-PCR	35
5.4 DETECÇÃO DE BCOV EM AMOSTRAS DE FEZES DE BOVINOS	37
5.5 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE RT-PCR E SEMI- <i>NESTED</i> PCR PARA O DIAGNÓSTICO DE BCOV	40
5.6 <i>NESTED</i> RT-PCR DIRIGIDA A AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S	40
5.7 RT-PCR DIRIGIDA AO GENE S COMPLETO	41
5.7 HEMI- <i>NESTED</i> RT-PCR DIRIGIDA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HE	41
5.8 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE GENEALÓGICA	42
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS	58
ANEXO A – RESULTADO DAS REAÇÕES DE PCR PARA OS GENES N, S E HE DE ACORDO COM A IDADE, SEXO, SISTEMA DE CRIAÇÃO E EXPLORAÇÃO E OCORRÊNCIA DE DIARREIA.	65
ANEXO B - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	69

1. INTRODUÇÃO

A diarreia neonatal bovina é reconhecida como uma das principais causas de morbidade e mortalidade em bezerros, ocasionando grandes perdas econômicas para a pecuária de leite e corte (BUZINARO et al., 2000). Como consequência a doença acarreta um aumento no custo de produção em decorrência a gastos com tratamento e profilaxia, queda no ganho de peso; aumento na conversão alimentar e morte dos animais acometidos (BAUMGARTNER, 2012).

A diarreia é um sinal clínico frequentemente observado durante as primeiras semanas de vida do animal, indicando um sinal clínico de enterite primária, septicemia ou toxemia. A sua frequência pode variar de acordo com os sistemas de criação e exploração, agente causal e resposta imune do hospedeiro (ASADI; BAGHINEZHAD; ASADI, 2015).

A etiologia da diarreia neonatal bovina é complexa, envolvendo fatores nutricionais, ambientais e biológicos. Com relação a sua origem pode ser classificada em: infecciosa e não infecciosa. A diarreia não infecciosa geralmente está relacionada a falhas no manejo alimentar e sanitário. A variação térmica, exposição a chuvas e ventos também são fatores predisponentes para o surgimento da doença (BAUMGARTNER, 2012). Enteropatógenos como vírus, bactérias e parasitas atuam isoladamente ou em associação na casuística de diarreia em bezerros. Entre os agentes infecciosos comumente envolvidos estão *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Criptosporidium spp*, Rotavírus e Coronavírus (LACERDA, 2014).

O coronavírus bovino (BCoV) assume um importante papel na etiologia das diarreias em bezerros em função da resistência da partícula viral, variabilidade genética e transmissibilidade, dificultando assim o seu controle. Embora a diarreia neonatal seja a principal evidência clínica, o BCoV também está implicado em doenças do trato respiratório e a disenteria de inverno em bovinos adultos (BUZINARO et al., 2000).

Apesar de sua relevância para a bovinocultura, estudos sistemáticos e abrangentes sobre a ocorrência e a caracterização genealógica do BCoV no Brasil não vêm sendo realizados. Diante deste cenário, a geração de conhecimento científico contribuirá para uma melhor compreensão acerca da diversidade genética do BCoV e seu padrão de evolução, fatores estes fundamentais para o delineamento e aprimoramento de medidas profiláticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRICO

O BCoV foi identificado pela primeira vez por Stair et al. (1972) em amostras fecais de bezerros com diarreia, em diversas propriedades de criação de bovinos no Estado de Nebraska, EUA. No mesmo ano, Mebus, Underdahl e Twiehaus (1972) ao reproduzirem experimentalmente um quadro diarreico em bezerros, observaram por microscopia eletrônica (ME) partículas virais que foram então denominadas de " *coronavirus-like* ". Em 1973, Mebus e colaboradores descreveram o isolamento do BCoV em células renais de embrião bovino.

Posteriormente, Honer et al. (1975) verificaram o envolvimento de BCoV em vacas adultas com uma síndrome de padrão sazonal denominada disenteria de inverno. Porém esta relação só pode ser confirmada em estudos subsequentes.

Mc Nulty et al.(1984) isolaram partículas virais morfológicamente semelhantes e antigenicamente indistinguíveis dos BCoVs entéricos a partir de tecidos pulmonares e traqueais de bezerros com sintomas respiratórios.

Storz et al. (2000) demonstraram através de postulados de Evans a associação dos coronavírus com a febre de transporte em bovinos, também evidenciando a participação de coronavírus em infecções do trato respiratório de bezerros.

No Brasil, a primeira descrição da ocorrência de coronavírus em bovinos foi feita por Jerez et al. (2002) em 16 propriedades de criação de gado leiteiro, localizadas no Estado de São Paulo. A partir de então estudos têm demonstrado a presença de BCoV nas regiões Norte, Sul, Sudeste e centro-oeste do país (ASANO et al., 2009; BRANDÃO et al., 2002; JEREZ et al., 2005; STIPP et al., 2009; TAKIUCHI et al., 2009).

2.2 ETIOLOGIA

De acordo com o comitê internacional para taxonomia de vírus (ICTV), os coronavírus pertencem à ordem Nidovirales, família *Coronaviridae*, subfamília *Coronavirinae*. Baseado nas propriedades genóticas e antigênicas a sub-família *Coronavirinae* está dividida em quatro gêneros denominados: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus* e *Deltacoronavirus* (Quadro 1), sendo o BCoV classificado dentro do gênero *Betacoronavirus* (ICTV, 2015).

Quadro 1. Coronavírus: gêneros, espécies virais e hospedeiros naturais.

Gênero	Espécie	Abreviatura	Hospedeiro
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Alphacoronavirus 1</i>	Alpha-1	Felinos, Caninos, Suínos
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Coronavírus Humano 229E</i>	HCoV-229E	Homem
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Coronavírus humano NL64</i>	HCoV-NL64	Homem
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Coronavirus1 do morcego Miniopterus</i>	Bat-CoV 1	Quirópteros
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Coronavirus HKU8 Morcego Miniopterus</i>	Bat-HKU8	Quirópteros
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Vírus da diarreia epidêmica suína</i>	PEDV	Suínos
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Coronavirus do morcego Rhinolophus HKU2</i>	Bat-CoV HKU2	Quirópteros
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Coronavírus do morcego Scotophilus 512</i>	Bat-CoV 512	Quirópteros
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Betacoronavirus 1</i>	Beta-1	Homem, Bovinos, Equinos, Caninos, Suínos
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Coronavírus humano HKU1</i>	HCoV-HKU1	Homem
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Coronavirus humano SARS</i>	SARS-CoV	Homem
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Vírus da hepatite murina</i>	MHV	Camundongo
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Coronavírus do morcego Pipistrellus HKU5</i>	Bat-CoV HKU5	Quirópteros
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Coronavírus do morcego Rousettus HKU9</i>	Bat-CoV HKU9	Quirópteros
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Coronavírus do morcego Tylonycteris HKU4</i>	Bat-CoV HKU4	Quirópteros
<i>Gammacoronavirus</i>	<i>Coronavírus aviário</i>	IBV, TCoV	Aves
<i>Gammacoronavirus</i>	<i>Coronavírus beluga SW1</i>	BWCoV-SW1	Cetáceos
<i>Deltacoronavirus</i>	<i>Bulbul coronavirus HKU11</i>	BuCoV	Aves
<i>Deltacoronavirus</i>	<i>Munia coronavirus HKU13</i>	MuCoV	Aves
<i>Deltacoronavirus</i>	<i>Tordo coronavirus HKU12</i>	ThCoV	Aves

Fonte: Adaptado de ICTV,2015.

Estruturalmente os coronavírus são vírus envelopados, pleomórficos com aproximadamente 100 - 120 nm de diâmetro, apresentando conforme a espécie viral cinco a seis proteínas estruturais identificadas como: (S) glicoproteína de espícula; (M) proteína integral de membrana; (HE) proteína hemaglutinina-esterase; (E) proteína pequena de membrana; (N) proteína fosforilada de nucleocapsídeo; (I) proteína interna (Figura 1).

O envelope é constituído por uma dupla camada lipídica com a projeção das proteínas estruturais, resultando no aspecto de uma coroa solar (do latim corona) quando observados ao microscópio eletrônico como é demonstrado na Figura 1 (TYRREL et al., 1968).

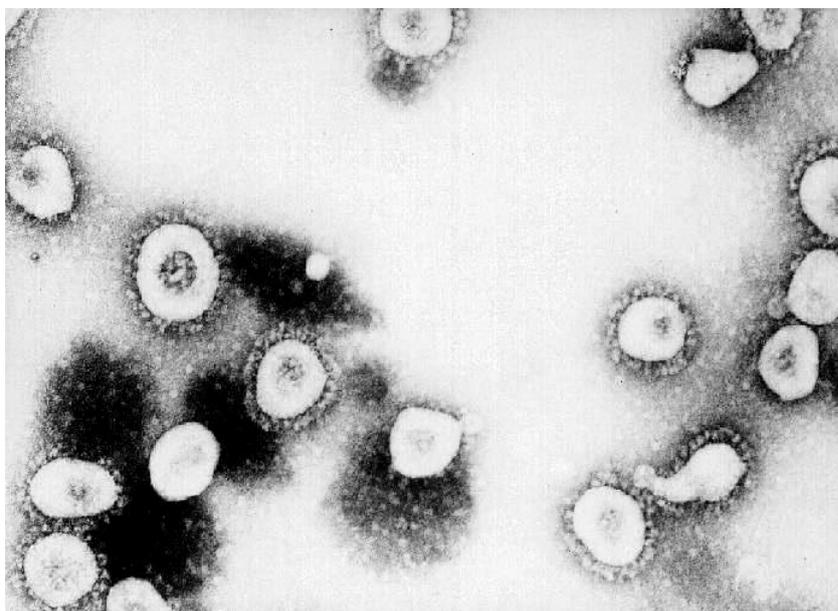


Figura 1: Eletromicrografia de partículas de coronavírus.

Fonte: Microbiology and Immunology online. Disponível em: <http://www.microbiologybook.org/virol/coronaviruses.htm>. Acesso em: 9. set. 2015

A proteína de nucleocapsídeo (N) é uma fosfoproteína de 50-60 KDa constituída aproximadamente por 455 aminoácidos e está associada diretamente ao RNA genômico viral, formando um nucleocapsídeo helicoidal. A proteína N desempenha uma variedade de funções relacionadas à patogênese, transcrição e replicação viral (BARIC et al., 1988; NARAYANAN et al., 2000).

A proteína integral de membrana (M) é a mais abundante proteína estrutural com cerca de 220-262 aminoácidos, sendo altamente conservada. A proteína M exerce uma importante função na formação da estrutura de envelope e do core, além de ser essencial na incorporação da glicoproteína S e proteína N no interior das partículas virais (NARAYANAN et al., 2000).

A proteína pequena de membrana (sM) também denominada de proteína E, participa juntamente com a glicoproteína M na formação da estrutura viral (NARAYANAN et al.,2000; AN et al., 1999).

Caracteristicamente, o gênero *Betacoronavirus* possui uma proteína de envelope denominada hemaglutinina esterase (HE) encontrada sob a forma de pequenos dímeros com aproximadamente 5 – 7 nm de diâmetro. A proteína HE contém atividade esterase na destruição de receptores específicos contendo resíduos 9-O-acetil de ácidos siálicos e também de hemaglutinação, apesar de conter pouca expressividade quando comparada a proteína S. Interessantemente essa proteína apresenta uma grande similaridade com a proteína HE do vírus influenza C, o que pode ser atribuído a uma possível recombinação entre um coronavírus ancestral e o vírus influenza C (KLAUSEGGER et al.,1999).

Outra particularidade encontrada em alguns membros do gênero *Betacoronavirus* como BCoV e MHV é a presença da proteína interna (I), com cerca de 23 KDa, cuja função no ciclo viral ainda não foi elucidado (FISCHER et al.,1997).

A glicoproteína de espícula (S) é a mais proeminente proteína estrutural de envelope dos coronavírus, com aproximadamente 150-180 KDa. A glicoproteína S é a principal responsável pela adsorção do vírus e pela atividade de fusão de membrana em células susceptíveis. Em alguns coronavírus como o IBV, MHV, e BCoV a glicoproteína S é proteoliticamente clivada em duas subunidades: S1 e S2 (YE; MORISON; MASTERS, 2004; ROWE et al.,1997).

A subunidade carbóxi-terminal S2 forma a haste da proteína S, sendo responsável pela formação de sincícios e pela fusão de membranas celulares. A subunidade S2 contém dois domínios: HR1 e HR2 (do inglês *heptad repeat*), sendo conservada entre as espécies de coronavírus (WENTWORTH; HOLMES, 2007).

A subunidade S1 é altamente polimórfica e forma a porção bulbar do ectodomínio amino-terminal da proteína S. Estas variações estão associadas a duas regiões presentes na subunidade S1: o domínio de ligação ao receptor celular (RDB) e regiões hipervariáveis (HVR). Sua função está relacionada à ligação a receptores celulares, constituindo-se o principal determinante antigênico viral (NAVAS et al., 2001). Estudos conduzidos com MHV têm demonstrado que a clivagem proteolítica da proteína S não é um passo essencial para infectividade viral, mas está sim relacionada com a formação de sincícios (TAKIUCHI et al.,2007).

Através da análise da proteína S seja na sua totalidade ou parcialmente pela seleção de domínios que apresentem maior polimorfismo é possível determinar a variabilidade genética e antigênica, estabelecer relações genealógicas e filogenéticas, bem como a busca de marcadores moleculares entre diferentes amostras de coronavírus (COMPTON; VIVAS-GONZALEZ; MACY, 1999).

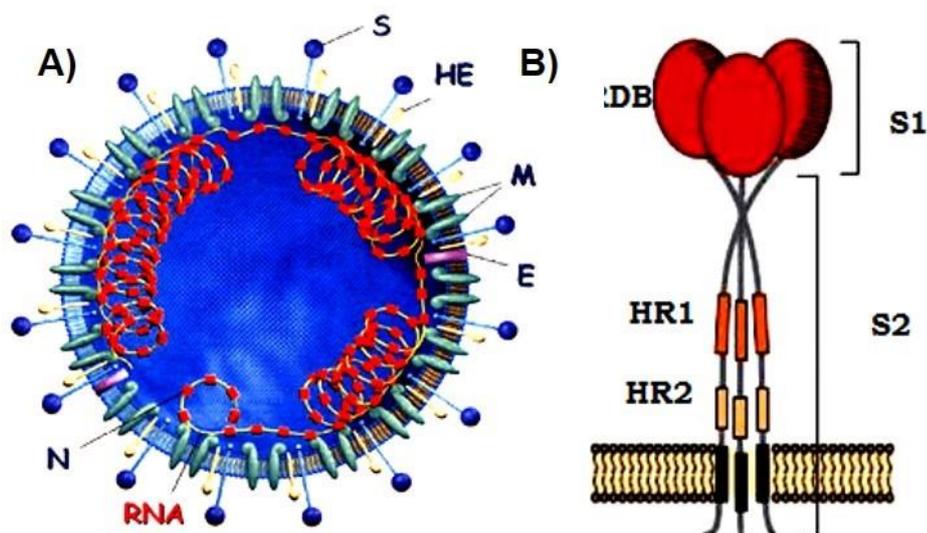


Figura 2: Representação esquemática do vírion (A) e da Glicoproteína S (B). Em detalhes (S) glicoproteína de espícula, (HE) proteína hemaglutinina-esterase, (M) glicoproteína de membrana, (E) proteína pequena de membrana e (N) proteína de nucleocapsídeo e em (B) as subunidades S1 e S2 e seus respectivos domínios. Fonte: www.nih.gov/catalyst2003/03.07/sarscorona.jpg. Acesso em: 9 set..2015.

O genoma viral é constituído por um RNA de fita simples (ssRNA) não segmentado de polaridade positiva com aproximadamente 27,3 – 31,3 Kb de tamanho. As extremidades 5´ e 3´ do RNA viral contêm proteção CAP e cauda poli A, além de regiões não traduzidas: 5´UTR e 3´UTR (UTRs do inglês *Untranslated region*) (SPAAN; CANAVAGH; HORZINEK, 1988).

De acordo com o grupo antigênico, o genoma dos coronavírus é organizado em 7 a 10 janelas de leitura (ORFs: do inglês *open reading frames*). O primeiro segmento genômico corresponde cerca de 60% da extremidade 5´ e é constituído por duas ORFs (ORF1a e ORF1b). Estas ORFs codificam uma poliproteína precursora da polimerase viral (Pol 1a e b), onde são transcritas 16 proteínas não estruturais (nsp1-nsp16). A porção restante do genoma viral é formada um conjunto de ORFs que codificam proteínas estruturais e acessórias (3 a, b, c e 7a e b) (SIDDELL; WEGE; MEULEN, 1983).

O RNA dos coronavírus é organizado na seguinte forma: 5´UTR-Pol-HE-S-3´ abc-sM-M-N-7ab-3´UTR como demonstra a Figura 3. Adicionalmente em cada extremidade 5´ e 3´ do genoma existem espaços intergênicos, que contêm sequências específicas de 6 a 10 nucleotídeos denominadas de sequências regulatórias de transcrição (TRS). Estas sequências são conservadas entre os coronavírus e são responsáveis pelo controle de transcrição de cada gene viral (SIDDELL; WEGE; MEULEN, 1983).

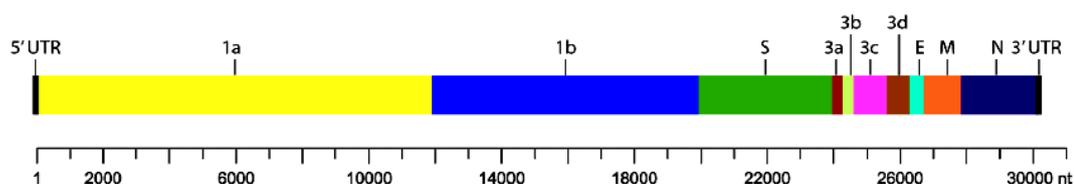


Figura 3: Organização genômica dos coronavírus.

Fonte: DOULKERIDOU, 2013.

A interação vírus-célula inicia-se pela ligação das proteínas S e HE com receptores celulares da membrana citoplasmática da célula hospedeira, induzindo a fusão do envelope com a membrana celular (IVANOV et al., 2004).

O BCoV utiliza o ácido siálico N-acetil 9-O-acetilneuraminico (9-O-ácido siálico acetilado) como receptor. De acordo com Schultze e Herrler (1992) a remoção enzimática do 9-O-ácido siálico acetilado reduz significativamente a infectividade do BCoV, sugerindo que estes receptores atuam no aumento da infecção e da concentração de partículas virais.

Além do ácido siálico N-acetil 9-O-acetilneuraminico, a glicoproteínas S interage com outros receptores tais como a aminopeptidase N (APN); a molécula de adesão célula-antígeno carcino-embriônico (CEACAM1) e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) (SCHULTZE; HERRLER, 1992) (Quadro 2).

Quadro 2. Coronavírus e seus receptores.

Espécie viral	Hospedeiro	Receptor
MHV	Camundongo	CEACAM-1
HCoV-229E	Humano	APN
FIPV	Felino	APN
TGEV	Suíno	APN
HCoV-NL63	Humano	Ace2
Sars-CoV	Humano	Ace2
HCoV-OC43	Humano	9-O-ácido siálico acetilado
BCoV	Bovino	9-O-ácido siálico acetilado

Fonte: Lai et al.,2007.

A replicação viral ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira infectada, não sendo necessárias funções nucleares diretas. O RNA genômico uma vez liberado atua como mRNA (RNA mensageiro) e a região 5' composta pelas ORFs 1a e 1b são traduzidas por ribossomos formando a poliproteína replicase (1ab). A poliproteína replicase 1ab é

processada pelas proteases virais *papain-like* e *poliovirus 3C-like*, sintetizando a RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) entre outras enzimas do complexo de replicação (IVANOV et al., 2004).

A RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp) atua como um molde para a síntese de um RNA de polaridade negativa complementar ao RNA genômico. O RNA de polaridade negativa sintetizará um novo RNA de polaridade positiva. Entretanto também são sintetizados múltiplos RNAs subgenômicos que atuarão como mRNA de proteínas virais e servirão de molde para transcrição do RNA viral. Os RNAs subgenômicos são formados por um mecanismo de transcrição descontínua (*leader-priming*), o que permite a formação de genomas recombinantes (HOMBERGER, 1997; SPAAN, 1984; IVANOV et al., 2004).

A tradução das proteínas virais é realizada por mRNAs individuais na porção 5'. As glicoproteínas HE, S e a proteína M são sintetizadas em polissomos associados ao retículo endoplasmático rugoso (RER). Enquanto as proteínas N e não estruturais são sintetizadas na matriz citoplasmática. A interação do RNA genômico com a proteína N forma um nucleocapsídeo helicoidal (HOMBERGER, 1997).

A glicoproteína S é co-traducionalmente glicolisada por resíduos de asparagina, sendo transportada do complexo de Golgi para a membrana citoplasmática. Já a proteína M é glicolisada por resíduos de serina ou treonina, onde então é transportada para o complexo de Golgi. O brotamento das partículas virais ocorre nas membranas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso (RER). Posteriormente as partículas virais são liberadas por citólise ou exocitose (HOMBERGER, 1997; SPAAN, 1984).

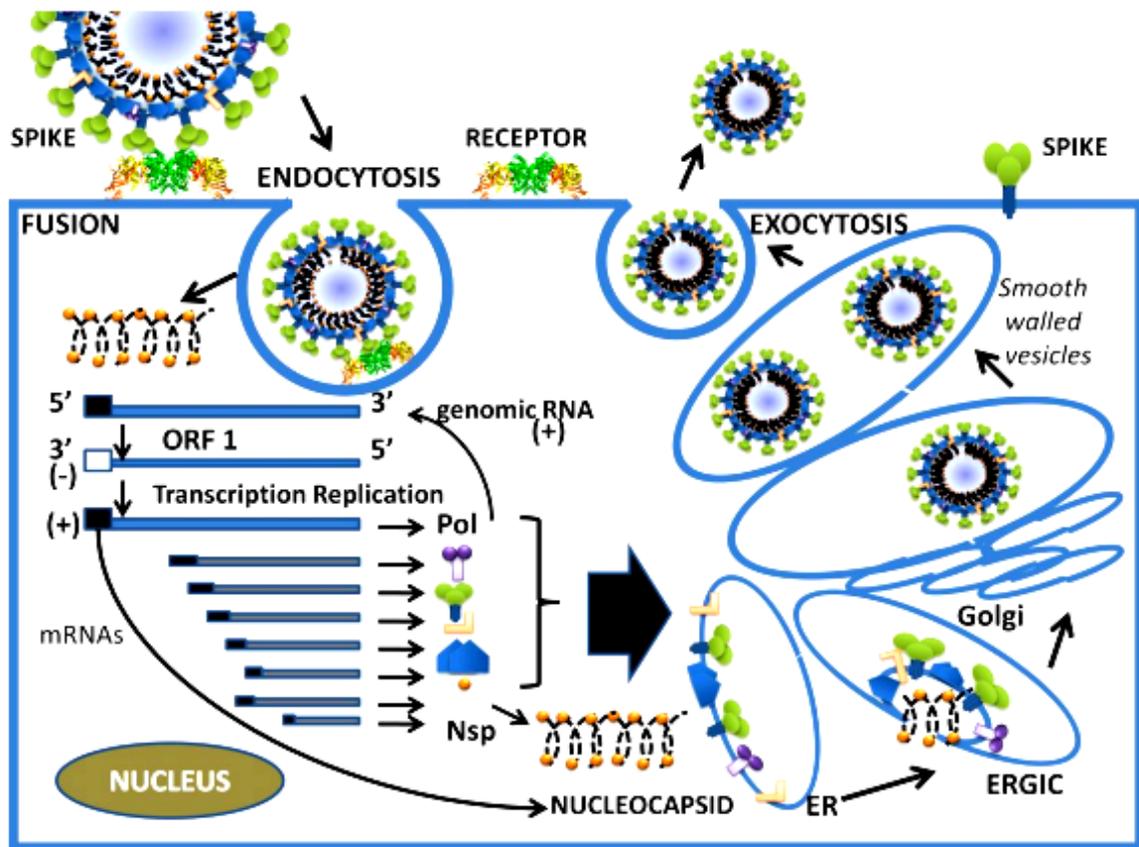


Figura 4: Esquema geral ilustrando o ciclo de replicação dos coronavírus.
Fonte: Mudgal (2014)

2.3 PATOGÊNSE E SINTOMATOLOGIA

Os coronavírus replicam-se nos enterócitos maduros presentes no epitélio colunar das vilosidades do intestino delgado, nas criptas do intestino grosso. Os BCoV's associados a diarreia neonatal ocasionam uma descamação rápida do epitélio. A descamação das células acarreta uma substituição dos enterócitos maduros por enterócitos cubóides e imaturos das criptas intestinais (BOILEAU; KAPIL, 2010).

Estas alterações resultam em atrofia e desnudamento das microvilosidades no intestino delgado e eventualmente no cólon e reto, ocasionando uma diarreia mal-absortiva. Paralelamente as células imaturas retêm parte da atividade secretora, o que leva a um aumento dos níveis de cálcio intracelular, provocando acidose metabólica e a perda osmótica de água (FOSTER; SMITH, 2009). Como resultado tem-se a redução de glicose e galactase e ao mesmo tempo o acúmulo de lactose pela mucosa intestinal, o que impede a absorção de água e eletrólitos pelo organismo, contribuindo conseqüentemente com o processo de desidratação (BOILEAU; KAPIL, 2010).

Clinicamente, os sintomas causados pelo BCoV em bezerros são mais severos quando comparado ao rotavírus bovino. A diarreia neonatal é caracterizada por sinais clínicos de febre (acima de $>38^{\circ}\text{C}$), hipoglicemia, depressão, fraqueza seguido de uma diarreia profusa. Em casos mais graves há desidratação severa, anorexia, insuficiência cardíaca e morte (FOSTER; SMITH, 2009).

2.4 TRANSMISSÃO E HOSPEDEIROS

Em bovinos, os coronavírus são transmitidos por aerossóis e pela via fecal-oral através da ingestão de água, alimentos e fômites contaminados. (RADOSTITS et al., 2007). O BCoV é eliminado a partir de secreções respiratórias e excreções do trato gastrointestinal.

As manifestações clínicas têm início 3 dias após o período de incubação, e a excreção viral pode persistir durante 2 semanas. Uma vez infectado o animal pode excretar pelas fezes cerca de 1 bilhão de partículas virais/ml dentro do período de 48hs (SAIF, 2010).

O BCoV tem sido detectado em amostras fecais de animais apresentando sinais sintomáticos e assintomáticos. A transmissão é frequentemente horizontal, onde animais adultos podem atuar como portadores da infecção. Até o momento não há registro de transmissão vertical (BOILEAU; KAPIL. 2010).

O risco de transposição da barreira de espécie tem sido alvo de diversas pesquisas. Os BCoVs têm sido isolados em ruminantes domésticos e silvestres de vida livre e cativeiro (Quadro 3), o que vêm os caracterizar como reservatórios (TSUNEMITSU; SAIF, 1995; ALEKSEEV et al., 1983; HASOKSUZ et al., 2007; MAJHDI et al., 1997). Entre as espécies encontradas no Brasil estão o *Buballus bubalis* (bufálo-asiático) e o *Odocoileus virginianus* (Veado-de-cauda-branca, Veado-da-Virgínia ou Cariacu).

A infecção de humanos por BCoV também tem sido evidenciada. Estudos realizados por Vijgen et al. (2005) e Bidokhiti et al. (2013), indicam que todos os coronavírus humanos (HCoV) tenham possivelmente origem zoonótica, sendo que algumas espécies de HCoV são geneticamente e antigenicamente similares aos coronavírus encontrado em bovinos. Um relato de transmissão acidental de BCoV para humanos foi descrito por Storz e Rott (2000).

Quadro 3. Animais domésticos e silvestres que atuam como reservatórios para o BCoV e sua distribuição geográfica.

Espécies	Distribuição Geográfica
<i>Buballus bubalis</i>	Mundial
<i>Giraffa camelopardalis</i>	África
<i>Cervus unicolor</i>	Ásia
<i>Odocoileus virginianus</i>	América do Norte, central e do sul
<i>Kobus ellipsiprymnus</i>	África
<i>Cervus elephas</i>	Europa, África e Ásia

O potencial de infecção interespecie dos coronavírus deve-se a adaptação da glicoproteína S a receptores de outras espécies. Dentre os fatores que induzem a adaptação e a diversidade dos coronavírus, destaca-se a alta taxa de recombinação genômica e os erros da RNA polimerase (HOMBERGER, 1997).

A capacidade de mutabilidade e recombinação genética dos coronavírus permite a adaptação a novos hospedeiros, podendo gerar consequências drásticas, tais como foram os casos de surtos epidêmicos da SARS e MERS (WOO et al., 2012).

2.5. EPIDEMIOLOGIA

Os coronavírus representam uma das principais causas da diarreia neonatal bovina. Em bezerros, o BCoV ocorre com maior frequência em animais em torno de 1 a 3 semanas de idade. Entretanto a sua presença tem sido descrita em bovinos de todas as idades (REYNOLDS et al., 1986).

O BCoV possui um alto índice de morbidade (100%), principalmente em animais em confinamento, porém a taxa de mortalidade é baixa (5 a 10%) quando não existe outra infecção subjacente. A severidade da doença e a propagação do agente estão associadas a diversos fatores predisponentes como: baixas temperaturas, ventilação deficiente, alta incidência de luz ultravioleta e umidade, práticas de manejo, idade, imunidade, estado nutricional do hospedeiro entre outros (SAIF, 1990; CHO et al., 2000).

Por ser um vírus envelopado e de RNA de fita simples, pressupõe-se que seja lábil e sensível às condições ambientais adversas. Entretanto, estudos conduzidos com SARS-

CoV, MHV e TGEV têm demonstrado que os coronavírus podem permanecer viáveis na água e em redes de tratamento de esgoto durante semanas (MULLIS et al., 2012).

Estes dados refletem a grande resistência dos coronavírus no meio ambiente, o que poderia explicar a ocorrência de novos surtos em rebanhos de uma mesma propriedade. Outra hipótese é que os surtos variam temporalmente, o que sugere a introdução de novos vírus, ao invés da latência ou existência de animais portadores (BOILEAU; KAPIL, 2010).

Considerando o impacto das diarreias neonatais para a pecuária, o BCoV assume uma grande importância epidemiológica. As frequências de BCoV encontradas variam substancialmente, sendo principalmente influenciada pelo método laboratorial eleito para a detecção viral. As infecções por BCoV são endêmicas e possuem distribuição mundial (BOILEAU; KAPIL, 2010).

Estudos realizados em Portugal, Nova Zelândia, Bélgica e Suíça demonstraram que a incidência de BCoV foi respectivamente de 24,2 %, 14,0%, 7,8% e 8,0% em bezerros diarreicos com até 30 dias de idade (BIDOKHTI et al., 2012; LACERDA, 2014; OHLSON; TRAVÉN; EMANUELSON, 2013).

Lojkic et al.(2015) investigaram a ocorrência de coronavírus e torovírus pela técnica de RT-PCR em rebanhos bovinos na Croácia. Durante um período de 3 anos foram analisadas 101 amostras de fezes de bezerros com gastroenterite, dentre as quais foram identificados 78,8% de casos positivos para BCoV.

Na Noruega, Gulliksen et al. (2009) avaliaram a prevalência de enteropatógenos em bezerros com ou sem diarreia. Através do teste de ELISA-anticorpo demonstrou-se que 39,3% dos animais eram soropositivos para BCoV.

Heckert et.al (1990) utilizando o teste de ELISA- antígeno observaram a prevalência de BCoV em 20,9% dos casos de diarreia neonatal nos Estados Unidos. No mesmo estudo, foi demonstrada a presença de BCoV em amostras não-diarreicas em 12,2% das amostras analisadas.

Bok et al. (2015) por meio do teste de ELISA-antígeno detectaram BCoV em 1,71% das amostras fecais de bezerros na Argentina, sendo que a frequência de coronavírus foi maior em rebanhos de corte (12,13%) em comparação aos rebanhos leiteiros (4,32%).

No Brasil, a ocorrência de BCoV associada a diarreia neonatal bovina tem sido relatada por alguns autores.

Takiuchi et al. (2006) por meio da técnica de semi-*nested* RT-PCR detectaram BCoV em 24,0% de amostras diarreicas de bezerros com até 30 dias de idade, provenientes de rebanhos de corte e leite dos Estados do Paraná, São Paulo e Mato Grosso do Sul.

Brandão et al. (2007) verificaram a participação de BCoV, rotavírus e *cryptosporidium parvum* em um surto de diarreia no município de Presidente Epitácio no Estado de São Paulo. Dentre a amostragem analisada 22,2% (2/9) das amostras foram positivas para coronavírus com coinfeções para rotavírus e *cryptosporidium parvum*.

Stipp et al. (2009) ao avaliarem fezes de bezerros com ou sem sinais clínicos de diarreia, em criações de gado de corte e leite localizadas nos Estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso e Minas gerais identificaram pela técnica de semi-nested RT-PCR a presença de BCoV em 19,8% dos animais sintomáticos e em 3,2% dos assintomáticos.

Em um estudo realizado por Lorenzetti et al. (2013) utilizando a mesma técnica descrita acima em 13 rebanhos de corte comerciais distribuídos nos Estados de Mato Grosso e Mato Grosso do sul, Minas gerais, Paraná e Rondônia, constataram a incidência de BCoV em 33,3% dos casos de diarreia neonatal bovina.

Recentemente, Coura et al. (2015) utilizando a técnica de PCR relataram a prevalência de BCoV em 68,6% das fezes diarreicas de bezerros com idade superior a 70 dias em fazendas leiteiras no município de Martinho Campos em Minas Gerais.

2.6 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR E EVOLUÇÃO

Métodos diagnósticos seguros que permitam a mensuração de frequências e estudos da cadeia epidemiológica do BCoV são fundamentais. No entanto por si só, não são o suficiente para a complexa tarefa de definir a variabilidade genética e a relação entre diferentes amostras (BRANDÃO, 2003a). Desta forma, as análises filogenéticas e genealógicas têm contribuído expressivamente na identificação de diferentes genótipos, padrões de infecção e propagação e evolução viral, assim como o surgimento de novas espécies.

Em termos de diversidade genética, uma das principais vertentes abordadas refere-se à existência de marcadores moleculares para a diferenciação entre amostras de BCoV detectadas de diferentes regiões geográficas e de animais com diarreia neonatal, disenteria de inverno ou com distúrbios respiratórios.

Atualmente as informações disponíveis na literatura acerca das características moleculares do BCoV são limitadas e esparsas, o que impede de compreender plenamente a epidemiologia do mesmo. Comparações entre estirpes de BCoV têm se baseado particularmente no sequenciamento parcial ou completo dos genes codificadores das proteínas S e HE.

Em um estudo realizado na Suécia e Dinamarca, Bidokhiti et al.(2013) propuseram a filogenia da sequência completa do gene S de 33 estirpes de coronavírus obtidos de processos entéricos e respiratórios em bovinos, as quais demonstraram uma baixa variabilidade genética, resultando em um único cluster.

Lojkic et al.(2015) ao analisar a subunidade S1 em BCoV entéricos provenientes da Croácia, observaram que estas amostras segregaram em um cluster único juntamente com estirpes virais da Suécia Dinamarca e Itália. Do mesmo modo, Kin et al.(2016) verificaram que amostras fecais e respiratórias positivas para BCoV e originárias da França formavam um grupo monofilético.

Park et al.(2006) através da análise genealógica dos genes S e HE em fezes de bovinos adultos com disenteria de inverno na Coreia do Sul, revelaram que todos os BCoVs foram distintos dos outros BCoVs conhecidos, sugerindo um novo caminho evolutivo para estes vírus. No mesmo ano, Ko et al.(2006) ao realizarem um estudo com base no gene HE de BCoV em animais com disenteria de inverno, diarreia neonatal e infecções respiratórias demonstraram que os BCoVs podiam ser divididos em três genótipos. O primeiro genótipo incluía apenas BCoVs detectados em infecções respiratórias, enquanto o segundo genótipo continha BCoV de bovinos com diarreia neonatal e disenteria de inverno. O terceiro genótipo possuía apenas estirpes coreanas de BCoV associada a disenteria de inverno, as quais estavam evolutivamente distantes dos demais BCoV conhecidos.

No Brasil, Brandão et al.(2006) e Takiuchi et al.(2008) descreveram a presença de dois genótipos para o gene S1 em amostras de BCoV nos Estados de São Paulo e Minas Gerais. Posteriormente, Souza et al.(2008) evidenciaram a existência de distintos padrões filogeográficos para os genes S e HE, sugerindo marcadores regionais para BCoV.

2.7 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial do BCoV pode ser realizado pela detecção direta do vírion, ácido nucleico viral, antígenos virais ou pela presença de anticorpos. Técnicas como a microscopia eletrônica; ensaios imunoenzimáticos; hemaglutinação (HA); inibição da hemaglutinação (HI); isolamento em cultivo celular; imunofluorescência; imuno-histoquímica e RT-PCR têm sido utilizadas (SAIF, 2010; ATHANASSIOUS et al., 1994; CHO et al., 2001; JEREZ et al., 2002; JEONG et al., 2005).

A microscopia eletrônica tem sido utilizada para resolver discrepâncias de resultados obtidos por outras técnicas, assim como permite a identificação de coinfeções. Porém partículas membranosas contidas no material fecal podem induzir a interpretações errôneas. Desta forma o uso da imunomicroscopia eletrônica garante uma maior sensibilidade à técnica (SAIF, 2010).

Os ensaios imunoenzimáticos com a utilização de anticorpos monoclonais ou policlonais tais como o ELISA e a imuno-histoquímica apresentam grande aplicabilidade como diagnóstico rápido, porém possuem baixa sensibilidade analítica e reatividade inespecífica na detecção de antígenos (ZHANG et al., 1997).

A mensuração de anticorpos séricos pelo método de virusneutralização permite verificar se houve a infecção por BCoV, quando amostras pareadas de soro são colhidas nas fases aguda e convalescente da doença e evidenciada soroconversão (TSUNEMTSU; SAIF, 1995).

Alguns métodos diagnósticos baseiam-se na propriedade hemaglutinante da glicoproteína HE dos coronavírus. O teste de hemaglutinação seguido pela confirmação da inibição da hemaglutinação constitui-se em uma técnica laboratorial simples de baixo custo operacional. Apesar destas vantagens, a presença de hemaglutininas não específicas e imunoglobulinas séricas (IgA) podem gerar resultados falso-positivos (SATO et al., 1977)

O isolamento de BCoV em monocamadas celulares não é rotineiramente utilizado como diagnóstico, por se tratar de uma técnica laboriosa e que requer várias passagens seriadas em razão da dificuldade da replicação viral *in vitro* (STIPP et al., 2009; TSUNEMTSU et al., 1991).

As linhagens celulares BEK-1 "*Bovine embryonic kidney*" (Rim embrionário bovino) "VERO" (Rim de macaco-verde Africano), MDBK "*Madin-Darby bovine kidney*" (Epitélio renal Bovino), PK-13 "*Porcine kidney*" (Rim de suíno), D2BFS "*Bovine fetal spleen*" (Baço fetal bovino), BEL "*Bovine embryonic lung*" (Pulmão embrionário bovino) e HRT-18 "*Human rectal tumor*" (Tumor retal humano) vêm sendo utilizadas. A linhagem HRT-18 apresenta maior sensibilidade para o isolamento de BCoV em amostras entéricas e respiratórias (STIPP et al., 2009; TSUNEMTSU et al., 1991).

Dada às limitações das metodologias diagnósticas convencionais, técnicas de biologia molecular como a RT-PCR qualitativa e a RT-PCR quantitativa têm se apresentado como uma valiosa ferramenta para o diagnóstico dos coronavírus (JEONG et al., 2005). Para tanto, a seleção de *primers* dirigidos ao gene que codifica a proteína N favorece significativamente a sensibilidade da técnica, uma vez que pertence a uma região conservada e que apresenta uma alta identidade entre as espécies de BCoV (BARIC et al., 1988).

2.8 CONTROLE E PROFILAXIA

Ainda não há um tratamento específico para as infecções por BCoV. A administração de antibióticos pode evitar infecções secundárias ou oportunistas. A fluidoterapia é utilizada como uma terapia de suporte primária em casos de gastroenterites (SCOTT et al., 2004).

As medidas de controle são baseadas em práticas adequadas de manejo zootécnico e sanitário. A adoção de procedimentos como: nutrição adequada, desinfecção do ambiente; limpeza da maternidade entre os partos; utilização de um bezerreiro individual, separação do rebanho de outras espécies de animais; quarentena e programas de vacinação tendem minimizar a disseminação da doença (BOLIEAU; KAPIL, 2010).

A desinfecção das baias e dos utensílios utilizados pelos trabalhadores pode ser feitas pelo uso de produtos a base de solventes lipídicos como o éter, hipoclorito de sódio, amônia quaternária ou iodo (SAIF, 2010).

O aumento da imunidade passiva e ativa em bezerros, mostra-se como uma medida efetiva para prevenir ou reduzir a severidade das infecções por BCoV. Esta proteção baseia-se na presença do anticorpo IgG1, o qual é adquirido pela ingestão do colostro ou do leite (HECKERT et al., 1991).

A vacinação é reconhecida como uma medida profilática eficaz (HECKERT et al., 1991; SAIF, 2010). Sua utilização é indicada em vacas seis semanas antes do parto, elevando significativamente os títulos de anticorpos séricos, os quais são transferidos para o colostro exercendo um efeito protetor local contra a enterite induzida pelo BCoV (HECKERT et al., 1991; SAIF, 2010). Estão comercialmente disponíveis no mercado vacinas vivas ou inativadas em combinação com rotavírus, *Escherichia coli* e *Clostridium perfringens* (KAPIL et al., 1999).

3. OBJETIVOS

- ✓ Otimizar e validar protocolos de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR dirigido ao gene codificador da proteína N para detecção de BCoV em amostras fecais de bezerros.
- ✓ Comparar a sensibilidade das técnicas de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR
- ✓ Pesquisar a ocorrência de BCoV em amostras fecais de bezerros de corte e de leite
- ✓ Verificar a existência de marcadores moleculares com base na sequência dos genes S, N e HE.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM

Foram incluídas neste estudo 114 amostras de fezes de bovinos, de ambos os sexos, com ou sem sinais clínicos de diarreia, com idade entre 1 a 15 meses, originárias de 15 rebanhos de corte e leite, dos Estados de São Paulo (n=33), Minas gerais (n=13), Mato Grosso (n=20), Bahia (n=44) e Santa Catarina (n=1), recebidas no Laboratório de Virose de Bovídeos (LVB) do Instituto Biológico de São Paulo, durante o período de 2008 a 2015. As amostras foram coletadas através de suabes ou diretamente da ampola retal e preservadas a - 20°C até o momento da análise.

Figura 5: Localização das amostras analisadas por municípios do Estado de São Paulo, no período de novembro de 2008 a dezembro de 2015.





Figura 6: Localização das amostras analisadas por municípios do Estado de Minas gerais, no período de novembro de 2008 a dezembro de 2015.



Figura 7: Localização das amostras analisadas por município do Estado de Santa Catarina, no período de outubro de 2014.

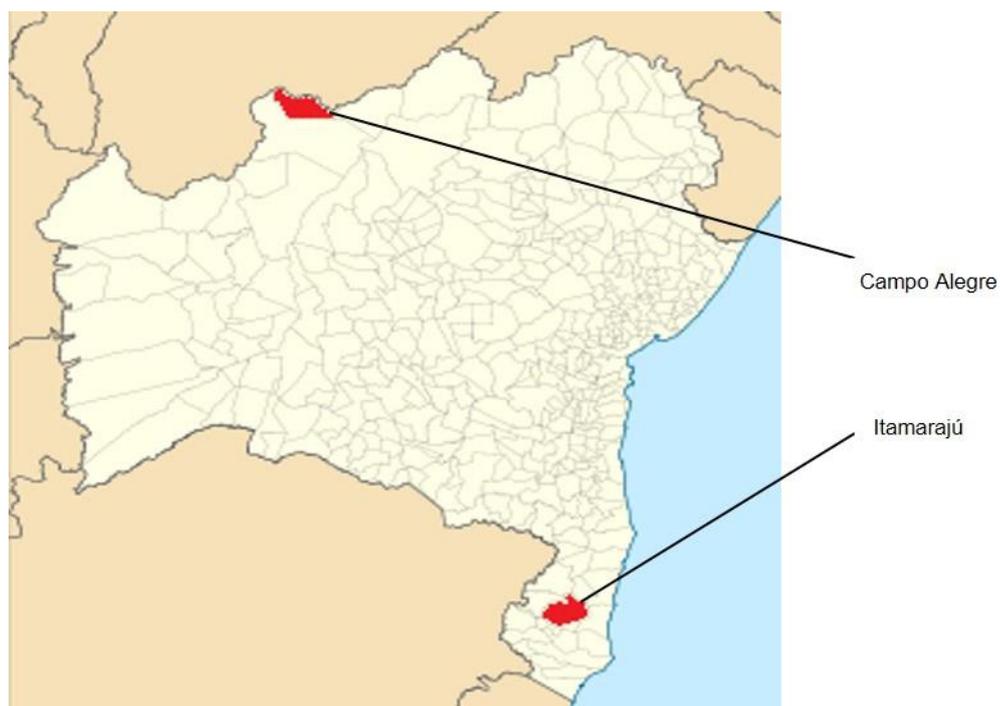


Figura 8: Localização das amostras analisadas por municípios do Estado da Bahia, no período de novembro de 2008 a dezembro de 2015.

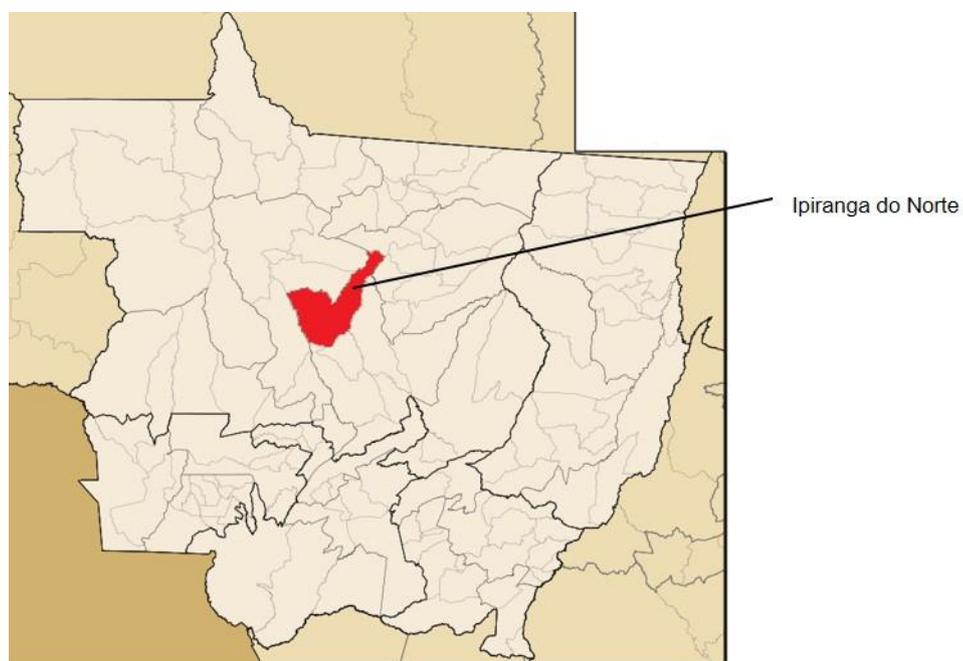


Figura 9: Localização das amostras analisadas por município do Estado do Mato Grosso, no período de novembro de 2008 a dezembro de 2015.

4.2 AMOSTRA DE REFERÊNCIA

Utilizou-se a amostra Kakegawa de coronavírus (AKASHI et al., 1980), mantida em cultura de células da linhagem HmLu-1 (pulmão de camundongo) com título hemaglutinante de 256, gentilmente cedida pelo Prof. Dr Paulo Eduardo Brandão da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

4.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES FECAIS

As amostras fecais foram preparadas como suspensões a 20% em PBS 0,01M pH 7,2 com 1% de solução antimicrobiana (penicilina G potássica 11.200 UI/mL; estreptomicina 0,01 g/mL; gentamicina 0,01 g/mL; L-glutamina 0,029 g/mL e anfotericina 0,5m g/mL) e clarificadas a 12.000 x g/30min a 4°C, tomando-se o sobrenadante como amostras.

4.4 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

A extração do RNA viral foi realizada pelo método Trizol, conforme as especificações descritas pelo fabricante (Invitrogen®):

Para cada 250 µL de alíquotas de suspensões fecais adicionou-se 750 µL de reagente Trizol. Após a incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio às amostras, incubando-se por 3 minutos em temperatura ambiente sendo posteriormente centrifugadas a 12000 x g/15 min a 4°C para obtenção da fase aquosa.

O RNA total da fase aquosa foi precipitado na presença de 500 µL de isopropanol, incubando-se a temperatura ambiente por 10 minutos e realizada a centrifugação a 12000 x g/ 10 min a 4°C. O sobrenadante obtido foi removido, o RNA precipitado ressuspenso em 1 mL de etanol a 75% e centrifugado a 7500 x g/5 min. A seguir descartou-se o sobrenadante retirando-se todo o excesso de etanol e ao final do procedimento o RNA total foi seco a 56 °C e ressuspenso com 20 µL de água Milli Q. O RNA viral foi armazenado a -80°C.

4.5 PESQUISA DE BCoV ATRAVÉS DE UMA SEMI-NESTED RT-PCR DIRIGIDA AO GENE N

O diagnóstico de triagem de BCoV nas amostras fecais foi realizado através de uma reação em cadeia pela polimerase dirigida à amplificação de um segmento de 306 pares de bases do gene codificador da proteína de nucleocapsídeo (N), utilizando-se a amostra Kakegawa como controle positivo e água DEPC como negativo. Os *primers* utilizados foram descritos por Asano et al.(2010) e se encontram no Quadro 4.

Quadro 4. *Primers* usados para a detecção do gene N do BCoV

Primers	Seqüência	Fragmento amplificado
BCOV1	5'AGAGCTCAAYCCAAGCAAAGCTGY 3'	463 pb (BCOV1+BCOV2)
BCOV2	5' AGCAGACCTTCCTGAGCCTTCAAT 3'	
BCOV3	5' TCAATRTCAGGTGCCATACTGGTCT 3'	306 pb (BCOV1 + BCOV3)

4.5.1 Aplicação de uma semi-*nested* RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína N de acordo com protocolo descrito por Asano et al., 2010

Síntese de DNA complementar (c-DNA) – Inicialmente adicionou-se 5µL do RNA extraído (item 4.4) ao *mix* contendo 1 µL de *random primer* (50ng/µL) e 4 µL de água DPEC, desnaturando a 65°C durante 5 minutos. Após esta etapa foi acrescentado a essa mistura um *mix* contendo 10 X RT Buffer, 25mM MgCl₂, 0,01 M DTT, 10mM de cada dNTP, 1 µL de SuperScript III (Invitrogen®) (200 U/µL), 1µL de inibidor de RNases (40U/µL) e 1,75 µL de água DPEC para um volume total de 20µL, realizando-se a transcrição reversa a 25°C/10 min, 50°C/50min e 85°C/5min.

Primeira amplificação e semi-*nested* PCR – Após a obtenção do DNA complementar foi realizada a reação de PCR pela adição de 5 µL de cada c-DNA ao *mix* de PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,2mM de cada *primer* (BCOV1 e BCOV2), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL água DPEC e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 50µL e submetidos a uma desnaturação inicial de 94°C/4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C/30s, 50°C/30s e 72°C/45s e 72°C/5 min para a extensão final.

A segunda amplificação ou *semi-nested* foi realizada adicionando-se 5 µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,2mM de cada *primer* (BCOV1 e BCOV3), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL de água DPEC e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 50µL e submetidos a uma desnaturação inicial de 94°C/4 min, seguido de 35 ciclos de 94°C/30s, 55°C/30s e 72°C/45s e 72°C/5 min para a extensão final.

Dois microlitros do produto da *semi-nested* foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com GelRed® e observado sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentarem a banda de 306pb.

4.5.2 Otimização e Validação de uma *semi-nested* RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína N

Foi otimizada e validada uma reação de *semi-nested* RT-PCR para a detecção de um fragmento de 306 pb do gene N, utilizando os *primers* (Quadro 4) descritos por Asano et al.(2010), uma vez que não foi possível reproduzir o resultado do autor nas condições e amostras. Entre as alterações propostas em relação ao protocolo original estão às mudanças de temperatura de transcrição e hibridização e as concentrações de reagentes.

4.5.2.1 Contaminação experimental e a avaliação da sensibilidade analítica

A otimização e a determinação da sensibilidade analítica da *semi-nested* RT-PCR gene N foram realizadas através de diluições em série na base logarítmica 10 (10¹ até 10⁹) da amostra padrão para coronavírus (cepa Kakegawa). Utilizaram-se dois tipos de diluentes: PBS e suspensões fecais a 20% negativas para BCoV.

4.5.2.2 Aplicação de uma *semi-nested* RT-PCR dirigida ao gene N

Para a validação da reação de *semi-nested* RT-PCR gene N foram testadas diferentes temperaturas de transcrição reversa, hibridização e concentrações de *primers*, conforme descrito a seguir.

Para a síntese de c-DNA e a PCR direcionada ao gene N foi utilizado o kit SuperScript®One-Step RT-PCR com Platinum®Taq (Invitrogen®). A reação de RT-PCR foi realizada pela adição de 5 µL de RNA (amostra Kakegawa não diluída) ao *mix* de PCR (25 µL de 2 x Reaction Mix (Invitrogen®), 0,2mM de cada *primer* (BCOV1 e BCOV2), 2µL de SuperScript® III RT/ Platinum® Taq Mix (Invitrogen®) e 16 µL água DPEC para um volume final de 25µL.

Inicialmente foram testadas diferentes temperaturas de transcrição reversa. A reação foi submetida a uma ciclagem de: 45°C, 50°C, 55°C e 60°C por 50 minutos e uma desnaturação inicial de 94°C/4 min seguido de 35 ciclos de 94°C/30s, 50°C/30s e 72°C/45s e 72°C/5 min para a extensão final.

Quadro 5. Gradientes de temperatura de hibridização dos *primers* BCOV1+ BCOV2 e BCOV1 + BCOV3.

Gradiente 1	Gradiente 2	Gradiente 3	Gradiente 4	Gradiente 5	Gradiente 6
50,0 °C	50,2 °C	50,7 °C	51,6 °C	52,7 °C	54,0 °C
Gradiente 7	Gradiente 8	Gradiente 9	Gradiente 10	Gradiente 11	Gradiente 12
55,4 °C	56,8 °C	58,1 °C	59,2 °C	60,0 °C	60,4 °C

Para a segunda amplificação ou *semi-nested* PCR foi adicionado 5 µL de cDNA ao *mix* de PCR contendo 25 µL de PCR Master Mix (50U/mL Taq DNA polimerase, 400µM de cada DNTP e 3mM de MgCl₂), 0,2mM de cada *primer* (BCOV1 e BCOV3) e 18 µL água DPEC para um volume final de 50µL e submetido a 94°C/4 min seguido de 35 ciclos de 94°C/30s, 50°C/30s e 72°C/45s e 72°C/5 min para a extensão final.

Foram analisados 2 µL do produto da PCR em eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed® e observado sob luz ultravioleta. As amostras que apresentaram bandas de 463 pb e 306 pb para primeira e segunda amplificação respectivamente, foram consideradas positivas. Após verificar a melhor temperatura de transcrição, testou-se 12 gradientes de temperatura de hibridização dos *primers*, como é demonstrado no Quadro 5.

A seguir, realizaram-se testes com diferentes concentrações de *primers* (Quadro 6) com as temperaturas que obtiveram maior especificidade. Foram consideradas como ideais as temperaturas e concentração de *primers* que apresentaram bandas do tamanho esperado com maior intensidade e menor número de bandas inespecíficas.

Após eleger a melhor condição e combinação de temperaturas e de *primers*, a amostra padrão Kakegawa foi analisada quanto ao seu limiar de detecção nos dois tipos de diluentes.

Quadro 6. Concentrações dos *primers* senso (BCOV1) e anti-senso (BCOV2 e BCOV3).

Primer senso (mM)	Primer anti-senso (mM)			
	0,2	0,19	0,17	0,15
0,2	0,2/0,2	0,2/0,19	0,2/0,17	0,2/0,15
0,19	0,19/0,2	0,19/0,19	0,19/0,17	0,19/0,15
0,17	0,17/0,2	0,17/0,19	0,17/0,17	0,17/0,15
0,15	0,15/0,2	0,15/0,19	0,15/0,17	0,15/0,15

4.6 APLICAÇÃO DE UMA NESTED RT-PCR DIRIGIDA A AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S

As amostras positivas na reação semi-*nested* RT-PCR dirigida ao gene N foram submetidas a uma *nested* RT-PCR para a amplificação de uma região hipervariável do segmento codificador da subunidade S1 da proteína S conforme descrito por Brandão et al. (2003b). Os *primers* utilizados estão demonstrados no Quadro 7.

Para a síntese de c-DNA adicionou-se 5µL do RNA extraído (item 4.4) ao *mix* contendo 1 µL de *random primer* (50ng/µL) e 4 µL de água DPEC, desnaturando a 65°C durante 5 minutos. Após esta etapa foi acrescentado a essa mistura um *mix* contendo 10 X RT Buffer, 25mM MgCl₂, 0,01 M DTT, 10mM de cada dNTP, 1 µL de SuperScript III (Invitrogen®) (200 U/µL), 1µL de inibidor de RNases (40U/µL) e 1,75 µL de água DPEC para um volume total de 20µL, realizando-se a transcrição reversa a 25°C/10 min, 50°C/50min e 85°C/5min.

Após a obtenção do c-DNA, a primeira amplificação foi realizada pela adição de 5 µL de cada c-DNA ao *mix* de PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (S1HS e S1HA), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL água DPEC e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 50µL, submetidos a 35 ciclos de 94°C/1 min, 53,4°C /1,5 min e 72°C/1 min, seguido por 72°C/10 min para a extensão final.

Para a segunda amplificação ou *nested* PCR adicionou-se 5 µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (S1NS e S1NA), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL de água DPEC e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 50µL submetidos a 25 ciclos de 94°C/1 min, 54,8°C/1,5 min e 72°C/1 min seguidos de 72°C/10 min para a extensão final.

A seguir, foram analisados 2 μL do produto da PCR em eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed[®] e observado sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram bandas de 488 pb.

Quadro 7. *Primers* usados para a detecção do gene S1 do BCoV

Primers	Sequência	Fragmento amplificado
S1HS	5' CTATACCCAATGGTAGGA 3'	885 pb (S1HS+S1HA)
S1HA	5' CTGAAACACGACCGCTAT 3'	
S1NS	5' GTTTCTGTTAGCAGGTTTAA 3'	488 pb (S1NS+S1NA)
S1NA	5' ATATTACACCTATCCCCTTG 3'	

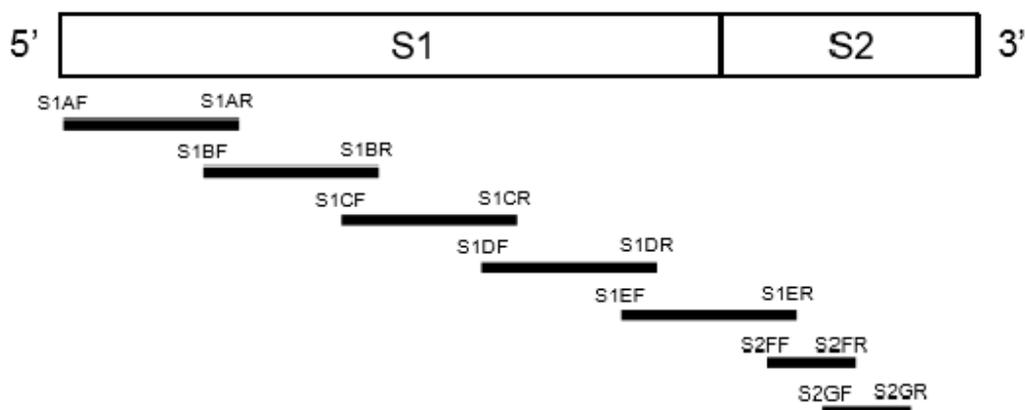
4.7 APLICAÇÃO DE UMA RT-PCR DIRIGIDA AO GENE S COMPLETO

As amostras positivas para BCoV também foram submetidas a uma RT-PCR para a amplificação completa do gene codificador da proteína S (Figura 10) de acordo com a metodologia mencionada por Brandão et al. (2003b), utilizando sete conjuntos de *primers* (Quadro 9) descritos por Hasoksuz et al. (2002) e Souza et al. (2010) de acordo com o seguinte protocolo.

A síntese de c-DNA foi realizada pela adição de 5 μL do RNA extraído (item 4.4) ao *mix* contendo 1 μL de *random primer* (50ng/ μL) e 4 μL de água DPEC, desnaturando a 65°C durante 5 minutos. Após esta etapa foi acrescentado a essa mistura um *mix* contendo 10 X RT Buffer, 25mM MgCl₂, 0,01 M DTT, 10mM de cada dNTP, 1 μL de SuperScript III (Invitrogen[®]) (200 U/ μL), 1 μL de inibidor de RNases (40U/ μL) e 1,75 μL de água DPEC para um volume total de 20 μL , realizando-se a transcrição reversa a 25°C/10 min, 50°C/50min e 85°C/5min.

Quadro 8. Primers usados para a detecção do gene S do BCoV. *Tm: Temperatura de *Melting*

Primers	Sequência	Fragmento amplificado	Tm ¹
S1AF	5' ATGTTTTTGATACTTTTA 3'	655 pb	50°C
S1AR	5' AGTACCACCTTCTTGATAAA 3'		
S1BF	5' ATGGCATTGGGATACAG 3'	490 pb	55°C
S1BR	5' TAATGGAGAGGGCACCGACTT 3'		
S1CF	5' GGGTTACACCTCTCACTTCT 3'	769 pb	58°C
S1CR	5' GCAGGACAAGTGCCTATACC 3'		
S1DF	5' GTCCGTGTAAATTGGATGGG 3'	827 pb	55 °C
S1DR	5' TGTAGAGTAATCCACACAGT 3'		
S1EF	5' TTACAAAAATCAAACACAGACAT 3'	877 pb	55 °C
S1ER	5' AAACCTTTATTACAATCGCTTCC 3'		
S1FF	5' TCAATTTTTCCCCTGTATTAGG 3'	555 pb	55 °C
S1FR	5' CMAGTCTRGATAGAATTTCTTGTA 3'		
S1GF	5' GCTACCAATTCTGCTTTAGTTA 3'	519 pb	55 °C
S1GR	5' GTAGTAATAACCACTACCAGTG 3'		

**Figura 10:** Representação esquemática das regiões amplificadas pela RT-PCR gene S

Primeira amplificação – A reação de PCR foi realizada pela adição de 5 µL de cada c-DNA ao *mix* de PCR (1 X PCR Buffer (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada primer, 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL água DPEC e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 50µL e submetidos a 35 ciclos de 94°C/1 min,

temperatura de hibridação de cada conjunto de primer (Quadro 8) e 72°C/1 min, seguido por 72°C/10 min para a extensão final.

Dois microlitros do produto da *nested* foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1,5 % corado com GelRed® e observado sob luz ultravioleta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram os fragmentos esperados conforme descrito no Quadro 7.

4.10 APLICAÇÃO DE UMA HEMI-NESTED RT-PCR DIRIGIDA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HE

Foi realizada uma reação de *hemi-nested* RT-PCR para a amplificação de um segmento de 441 pares de bases codificador da proteína HE segundo protocolo descrito por Souza et al. (2010), a todas as amostras positivas para BCoV mencionadas nos itens anteriores. Os *primers* utilizados estão descritos no Quadro 9.

Quadro 9. *Primers* usados para a detecção do gene HE do BCoV

Primers	Seqüência	Fragmento amplificado
CHES	5' TMTTTGGYGACAGTCCTTC 3'	796 pb (CHES+CHEA)
CHEA	5' TTATCMGAMTGACYTRGCATT 3'	
HE-NA	5' CCCCAAATTAGCTTCACGA3'	441 pb (CHES+HE-NA)

A transcrição reversa foi feita através da adição de 5µL do RNA extraído (item 4.4) ao mix contendo 1 µL de *random primer* (50ng/µL) e 4 µL de água DPEC, desnaturando a 65°C durante 5 minutos. Após esta etapa foi acrescentado a essa mistura um *mix* contendo 10 X RT Buffer, 25mM MgCl₂, 0,01 M DTT, 10mM de cada dNTP, 1 µL de SuperScript III (Invitrogen®) (200 U/µL), 1µL de inibidor de RNases (40U/µL) e 1,75 µL de água DPEC para um volume total de 20µL, realizando-se a transcrição reversa a 25°C/10 min, 50°C/50min e 85°C/5min.

Realizou-se a primeira amplificação pela adição de 5 µL de cada c-DNA ao *mix* de PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen®), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (CHES e CHEA), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL água DPEC e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) para um volume final de 50µL, submetidos a uma desnaturação inicial de 94°C/4 min seguidos de 35 ciclos de 94°C/1 min, 58,4°C /1,5 min e 72°C/1 min, seguido por 72°C/10 min para a extensão final.

Para a segunda amplificação ou *hemi-nested* PCR adicionou-se 5 µL do produto da primeira amplificação ao *mix* de PCR (1 x PCR Buffer (Invitrogen[®]), 0,2mM de cada dNTP, 0,5 pmol/µL de cada *primer* (CHES e HE-NA), 1,5mM MgCl₂, 25,25 µL de água DPEC e 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen[®]) para um volume final de 50µL submetidos a de 94°C/3 min e 25 ciclos de 94°C/45s, 53,4 °C /45s e 72°C/45s seguidos de 72°C/10 min para a extensão final.

A seguir, foram analisados 2 µL do produto da PCR em eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed[®] e observado sob luz ultra-violeta. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram bandas de 441pb.

4.11 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os fragmentos correspondentes aos genes N, S1 e S foram purificados a partir do produto de amplificação com o kit QIAquick PCR purification (Qiagen), quantificado visualmente com GeneRuler[®] 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante e submetidos ao sequenciamento de DNA em sequenciador automático DNA 3500XL Genetic Analyze (AppliedByosystems[®]).

A reação de sequenciamento consistiu em 4µL de BigDye[®] Terminator v3.1 (AppliedByosystems[®]), 4µL de 5x Sequencing buffer (AppliedByosystems[®]), 4 pmol de cada *primer* senso e antisenso referente a cada gene em reações separadas e 11,6 µL do DNA alvo para uma reação final de 20µL, levando-se ao termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf[®] 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 o kit Centrisep (Princeton) segundo as recomendações do fabricante:

Inicialmente, colunas contendo resina e acopladas a um tubo coletor foram hidratadas com 800 µL de água ultrapura esterilizada, centrifugando a 750 x g/2min para a remoção de fluidos residuais. A seguir, adicionou-se o produto da reação de sequenciamento a coluna, centrifugando-se a 750 x g/2min e secando o precipitado a temperatura ambiente durante 50 min. Após esta etapa, acrescentou-se 10 µL de formamida HI-DI e transferiu-se as amostras ao sequenciador.

Os cromatogramas gerados para cada uma das sequências senso e antisenso de cada amostra e gene foram submetidos ao aplicativo Phredonline em [http:// asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/](http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/) para avaliação da qualidade dos mesmos. A seguir, conferiu-se os cromatogramas manualmente com o programa Chromas v. 2.23 (© 1998-2002

Tech~enelysiumm Pty LTD) para a busca por erros de interpretação e discrepâncias entre cada uma das fitas sequenciada.

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

4.11 ANÁLISE GENEALÓGICA

As sequências finais de cada gene para cada amostra foram alinhadas com sequências homólogas de BCoV recuperadas do *GenBank* com o programa Bioedit (Quadro 10).

As identidades entre as sequências de nucleotídeos alinhadas, bem como a identidade e similaridade de aminoácidos alinhados com a matriz BLOSUM62, foram calculadas com o programa Bioedit.

Os alinhamentos foram utilizados para a geração das árvores genealógicas pelo método de máxima verossimilhança, através do algoritmo Jukes-cantor com 1000 repetições de *bootstrap* através do programa MEGA 6.0.

Quadro 10. Sequências de BCoV com base no gene codificador da proteína N e de coronavírus bubalino recuperadas do *GenBank*, segundo o número de acesso, identificação, país de origem, hospedeiro, tipo de amostra e ano de realização do sequenciamento.

<i>Genbank</i>	<i>Amostra</i>	<i>País</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Origem</i>	<i>Ano</i>
<i>KT318095</i>	Caen 13	França	Bezerro	Fecal	2014
<i>KT318096</i>	Caen 14	França	Bezerro	Fecal	2004
<i>EF193074</i>	V270	Alemanha	-	Fecal	2007
<i>EU401985</i>	BC94	Coréia	-	Vacinal	2009
<i>EU401983</i>	A3	Coréia	-	MDBK	2009
<i>EU401984</i>	SUN5	Coréia		MDBK	2009
<i>FJ556872</i>	YC	China	Bezerro	-	2002
<i>U007352</i>	Mebus	EUA	Bezerro	MDBK	1993
<i>AF391542</i>	LUN	EUA	Bezerro	HRT-18	2002
<i>DQ811784</i>	DB2	EUA	Bezerro	HRT-18	2011
<i>U007352</i>	Quebec	Canadá	-	MDBK	2003
<i>DQ479424</i>	Kakegawa	Japão	Vaca	HRT-18	2007
<i>JF345157</i>	WDBR-B1	Brasil	Vaca	Fezes	2013
<i>GU808341</i>	WDBR-96	Brasil	Vaca	Vaca	2010
<i>JF3451681</i>	USP1	Brasil	Vaca	Fecal	2013
<i>JF345169</i>	USP3	Brasil	Vaca	Fecal	2013

4.12 ANÁLISE DOS DADOS

Para a análise estatística foi utilizado o teste de qui-quadrado pelo *software* GraphPrism 6.0. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 APLICAÇÃO DE UMA SEMI-NESTED RT-PCR DIRIGIDA AO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA N DE ACORDO COM O PROTOCOLO DESCRITO POR ASANO et al., 2010

Com o intuito de validar e verificar a acurácia de uma reação de PCR para BCoV, inicialmente testou-se uma *semi-nested* RT-PCR dirigida ao gene N conforme descrito por Asano et al.(2010) em três amostras sabidamente positivas para BCoV, sendo uma controle padrão (item 4.2) e duas amostras de campo.

Como está demonstrado na Figura 11 quando reproduziu-se o protocolo recomendado por Asano et al. (2010) pode-se observar que tanto para o controle padrão como para as amostras de campo identificou-se o fragmento esperado de 306 pb, porém com a formação de muitas bandas inespecíficas. Este fato motivou esta pesquisa com o objetivo de otimizar e validar a reação para a obtenção de melhores resultados.

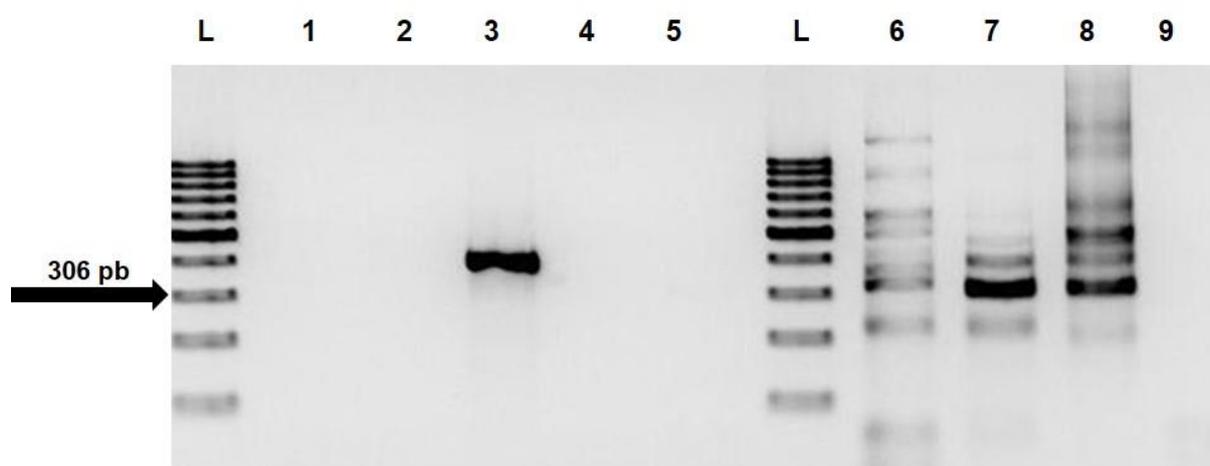


Figura 11: Gel de agarose a 1.5% corado com GelRed[®](1:150) demonstrando o fragmento esperado de 306 pb. Coluna L: padrão de peso molecular (*ladder* 100pb); coluna 1: amostra fecal; coluna 2: amostra fecal; coluna 3 e 8: controle padrão; coluna 4 e 9: controle negativo. Colunas 1 a 5: primeira amplificação (RT-PCR) e Colunas 6 a 10: segunda amplificação (*semi-nested*).

5.2 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA SEMI-NESTED PCR DIRIGIDA AO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA N

5.2.1 Determinação das temperaturas ótimas de transcrição reversa

Todas as temperaturas de transcrição reversa permitiram a detecção do fragmento esperado de 463 pb (Figura 12). Contudo a reação apresentou bandas específicas e inespecíficas de intensidade semelhante, demonstrando não haver uma diferença significativa entre elas. Com o intuito de elevar a sensibilidade analítica da reação, a temperatura de 50°C foi escolhida para o prosseguimento das etapas da otimização.

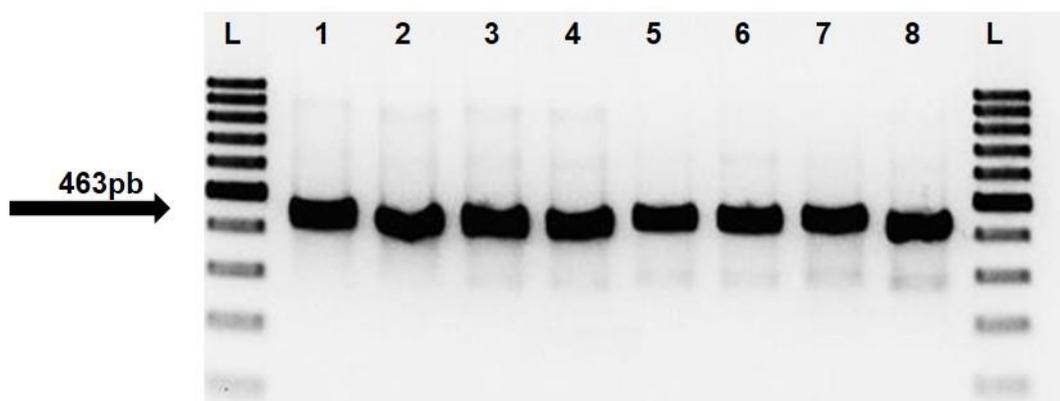


Figura 12: Gradientes de temperatura de transcrição reversa da RT-PCR dirigida ao gene N em eletroforese em gel de agarose a 1,5%. L: Peso de 100 pb; Colunas 1-2: 45°C; Colunas 3-4: 50°C; Colunas 5-6: 55°C; Colunas 7-8: 60°C

5.2.2 Determinação das temperaturas ótimas de hibridização

Nas temperaturas de hibridização de 50,2°C a 60,4°C testadas para os *primers* BCOV1 + BCOV2 foi possível visualizar o fragmento esperado de 463 pb como mostra a Figura 13. Estas temperaturas apresentaram a mesma intensidade de bandas, porém observou-se a presença de bandas inespecíficas de 600 e 900pb à medida que aumentava a temperatura de hibridização. Portanto, elegeu-se para a RT-PCR gene N uma temperatura ótima de hibridização de 50,2°C por não apresentar bandas inespecíficas.

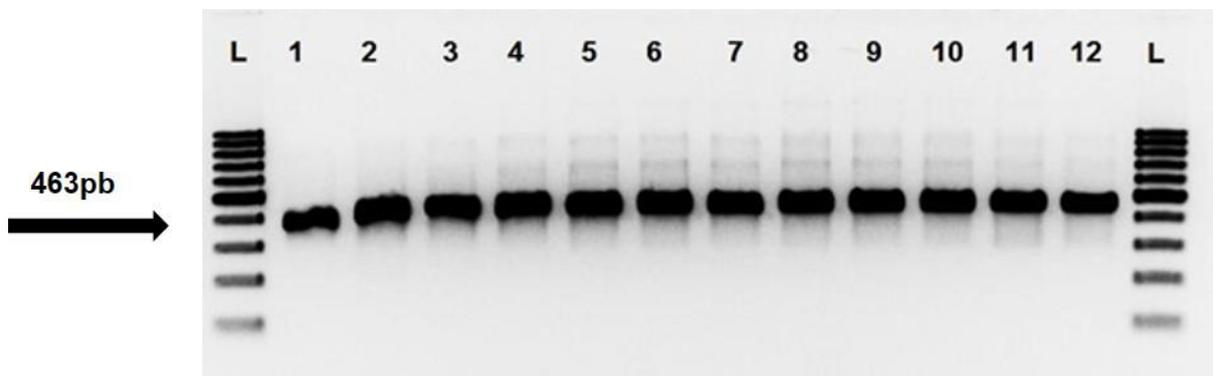


Figura 13: Gradientes de temperatura de hidridização dos *primers* BCOV1 +BCOV2 dirigida ao gene N em eletroforese em gel de agarose a 1.5%. L: Peso de 100 pb; Coluna 1: 50°C; Coluna 2: 50,2°C; Coluna 3: 50,7°C; Coluna 4: 51,6°C; Coluna 5: 52,7°C; Coluna 6: 54,0°C; Coluna 7: 55,4°C; Coluna 8: 56,8°C; Coluna 9: 58,1°C; Coluna 10: 59,2°C; Coluna 11: 60°C; Coluna 12: 60,4°C.

Para os *primers* BCOV1+BCOV3 utilizados na segunda amplificação, verificou-se o fragmento esperado de 306 pb em todas as temperaturas avaliadas. Também foram observadas bandas inespecíficas, os quais aumentavam à medida que a temperatura de hibridização era mais alta (Figura 14). A temperatura de hibridização de 50,2°C foi considerada ideal por apresentar uma menor quantidade de bandas inespecíficas.

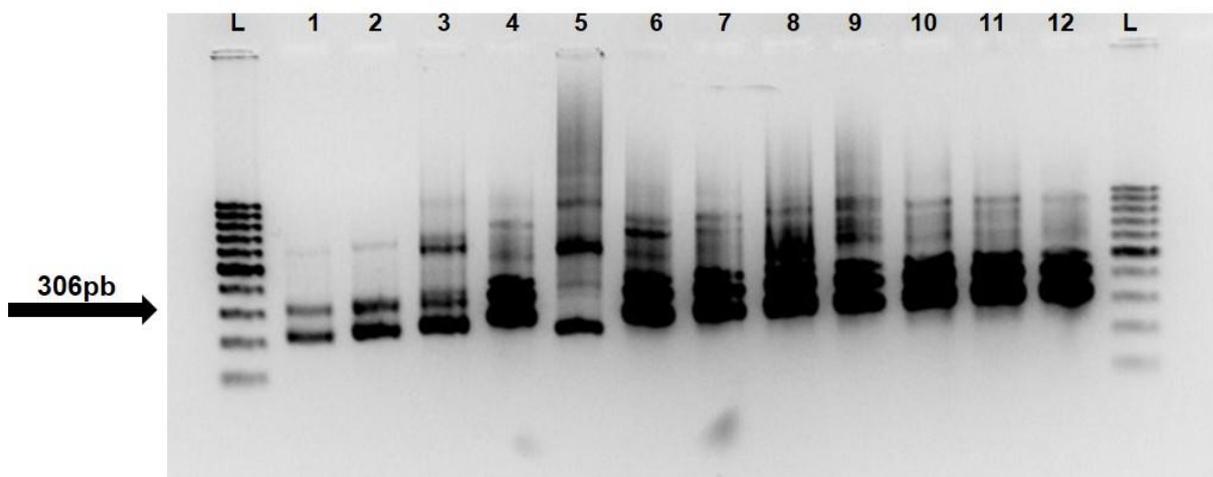


Figura 14: Gradientes de temperatura de hidridização dos *primers* BCOV1 +BCOV3 dirigida ao gene N em eletroforese em gel de agarose a 1.5%. L: Peso de 100 pb; Coluna 1: 50°C; Coluna 2: 50,2°C; Coluna 3: 50,7°C; Coluna 4: 51,6°C; Coluna 5: 52,7°C; Coluna 6: 54,0°C; Coluna 7: 55,4°C; Coluna 8: 56,8°C; Coluna 9: 58,1°C; Coluna 10: 59,2°C; Coluna 11: 60°C; Coluna 12: 60,4°C

5.2.3 Sensibilidade analítica da semi-nested RT-PCR

Ao obter as temperaturas ótimas de transcrição reversa e hibridização, avaliou-se o limiar de detecção da amostra padrão Kakegawa em diluições seriadas em PBS e suspensão fecal a 20%. A sensibilidade analítica da RT-PCR e semi-nested PCR para as diluições em PBS e suspensão fecal a 20% foi de 10^{-3} e 10^{-7} respectivamente, sendo que o controle negativo não apresentou banda. Entretanto, verificou-se também o aparecimento de algumas bandas inespecíficas nas diluições mais altas em suspensão fecal a 20%.

Com o intuito de minimizar a formação de ligações inespecíficas foram testadas diversas concentrações de *primers*. A concentração de 0,2mM para BCOV1 + BCOV2 e BCOV1 + BCOV3 foi considerada a ideal, pois além de não apresentar bandas inespecíficas, manteve a sensibilidade da reação.

Determinadas as melhores concentrações de *primers*, todas as diluições em PBS e suspensão fecal a 20% foram testadas em triplicada e em dias diferentes. As reações mantiveram o limiar de detecção de 10^{-3} para PBS e 10^{-7} para suspensão fecal a 20% (Figura 15, 16, 17 e 18) em ambas reações (primeira e segunda amplificação), indicando a reprodutibilidade e confiabilidade do uso da técnica para o a detecção de BCoV.

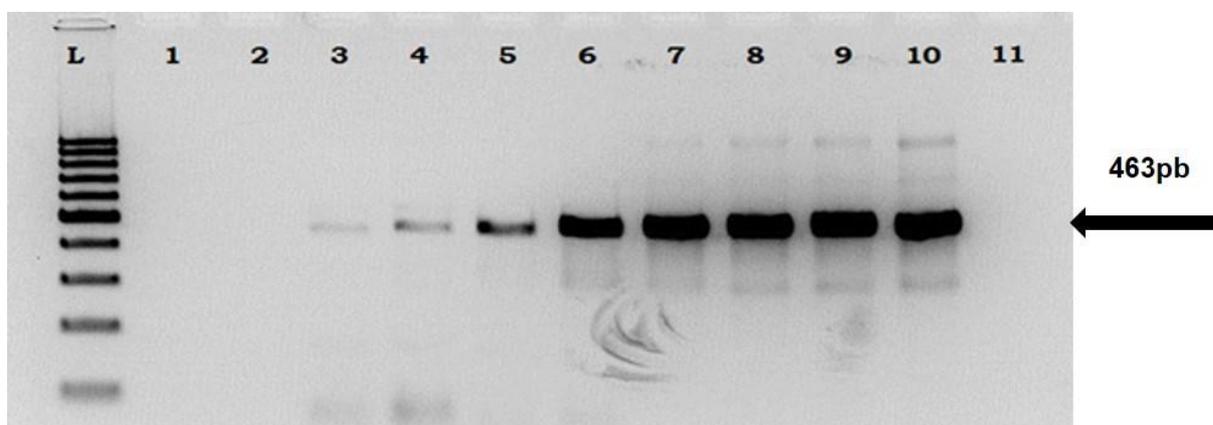


Figura 15: Limiar de detecção em suspensão fecal a 20% da RT-PCR dirigida ao gene N em eletroforese em gel de agarose a 1.5%. L: Peso de 100 pb; Coluna 1: 10^{-9} ; Coluna 2: 10^{-8} ; Coluna 3: 10^{-7} ; Coluna 4: 10^{-6} ; Coluna 5: 10^{-5} ; Coluna 6: 10^{-4} ; Coluna 7: 10^{-3} ; Coluna 8: 10^{-2} ; Coluna 9: 10^{-1} ; Coluna 10: 10^0 ; Coluna 11: controle negativo.

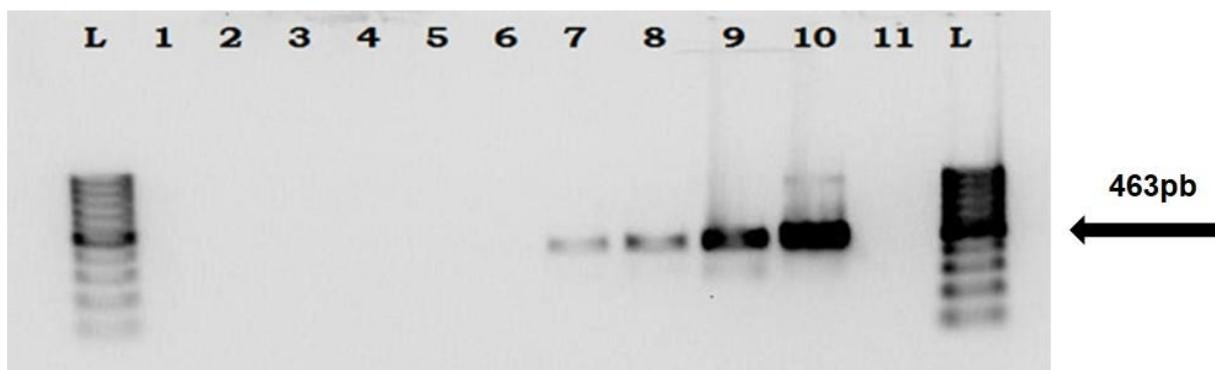


Figura 16: Limiar de detecção em PBS da RT-PCR dirigida ao gene N em eletroforese em gel de agarose a 1.5%. L: Peso de 100 pb; Coluna 1: 10^{-9} ; Coluna 2: 10^{-8} ; Coluna 3: 10^{-7} ; Coluna 4: 10^{-6} ; Coluna 5: 10^{-5} ; Coluna 6: 10^{-4} ; Coluna 7: 10^{-3} ; Coluna 8: 10^{-2} ; Coluna 9: 10^{-1} ; Coluna 10: 10^0 ; Coluna 11: controle negativo.

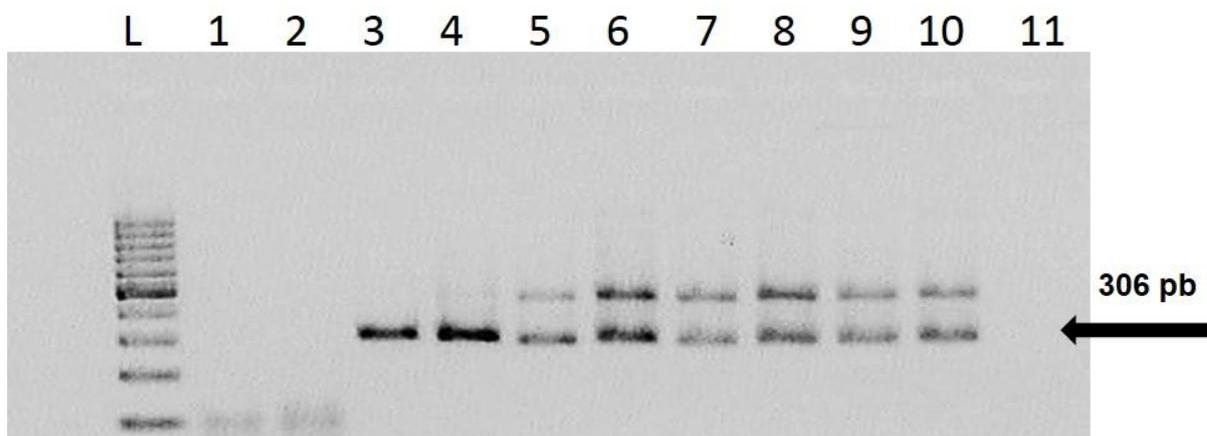


Figura 17: Limiar de detecção em suspensão fecal a 20% da semi-*nested* RT-PCR dirigida ao gene N em eletroforese em gel de agarose a 1.5%. L: Peso de 100 pb; Coluna 1: 10^{-9} ; Coluna 2: 10^{-8} ; Coluna 3: 10^{-7} ; Coluna 4: 10^{-6} ; Coluna 5: 10^{-5} ; Coluna 6: 10^{-4} ; Coluna 7: 10^{-3} ; Coluna 8: 10^{-2} ; Coluna 9: 10^{-1} ; Coluna 10: 10^0 ; Coluna 11: controle negativo

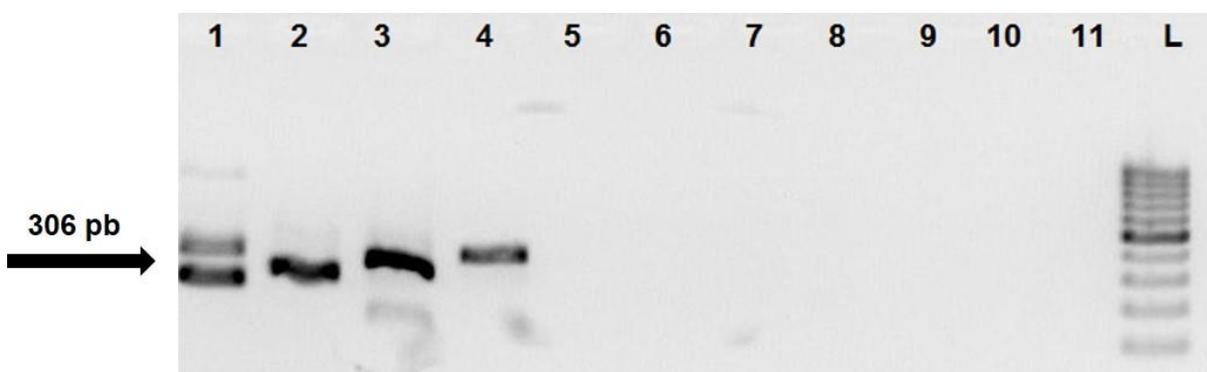


Figura 18: Limiar de detecção em PBS da semi-*nested* RT-PCR dirigida ao gene N em eletroforese em gel de agarose a 1.5%. L: Peso de 100 pb; Coluna 1: 10^0 ; Coluna 2: 10^{-1} ; Coluna 3: 10^{-2} ; Coluna 4: 10^{-2} ; Coluna 5: 10^{-4} ; Coluna 6: 10^{-5} ; Coluna 7: 10^{-6} ; Coluna 8: 10^{-7} ; Coluna 9: 10^{-8} ; Coluna 10: 10^{-9} ; Coluna 11: controle negativo

5.4 DETECÇÃO DE BCOV EM AMOSTRAS DE FEZES DE BOVINOS

As técnicas de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR validadas neste estudo permitiram demonstrar a ocorrência de BCoV em fezes de bezerros. Os pares de *primers* BCOV1+BCOV3 produziram fragmentos de c-DNA 306pb. Os controles negativos incluídos não apresentaram quaisquer bandas, indicando que não houve contaminação por DNA amplificado (Figura 19).

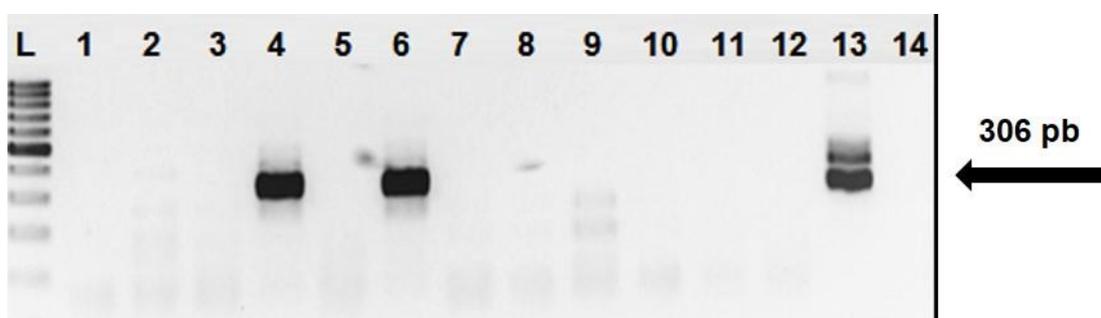


Figura 19: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed[®](1:150) mostrando o fragmento esperado de 306 pb nos resultados da *semi-nested* RT-PCR para o gene N. Coluna L: padrão de peso molecular (*ladder* 100pb); Colunas 1-12: amostras fecais testadas; Coluna 13: controle positivo para BCoV (cepa Kakegawa); Coluna 14: controle negativo.

De um total de 114 amostras fecais analisadas pela *semi-nested* RT-PCR dirigida ao gene codificador da proteína N, observou-se 14,91% (17/114) de positividade para BCoV em relação as amostras individuais. Ao considerar os rebanhos a frequência de BCoV foi de 56,25 % (9/16).

Com relação à sintomatologia, verificou-se que 22,72% (10/44) dos animais positivos para BCoV apresentavam diarreia e 10% (7/70) eram assintomáticos. Entretanto não foi observada uma correlação significativa ($p > 0,05$) como consta na Tabela 1.

Tabela 1. Porcentagem de animais positivos de acordo com a presença ou ausência de manifestações clínicas

Manifestação clínica	Positivas (n /%)	Negativas (n/%)	Total
Diarreia	(10/22,72)	(34/77,28)	44
Assintomático	(7/10,0)	(7/90,0)	70
Total	(17/14,91)	(97/85,08)	114

*p= 0,1232 (Teste do X²)

Considerando o total de amostras positivas para BCoV, observou-se uma maior frequência de ocorrência de casos nos estados de Minas Gerais e da Bahia. No estado de Santa Catarina apenas uma amostra foi analisada, sendo ela positiva. A presença do BCoV também foi constatada nos estados de São Paulo e Mato Grosso. O percentual de positividade de BCoV detectados por estado e município encontra-se listado na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição de amostras positivas para BCoV por estados e municípios brasileiros

Localidade	Amostras positivas/		Rebanhos	
	Total	%	positivos/Total	%
São Paulo	3/33	9,09	3/7	42,85
Angatuba	0/1	0,0	0/1	0,0
Bragança Paulista	0/1	0,0	0/1	0,0
Cotia	0/2	0,0	0/1	0,0
Eldorado	1/2	50,0	1/1	100,0
Pindamonhangaba	1/25	4,0	1/1	100,0
Descalvado	1/2	50,0	1/2	50,0
Minas Gerais	2/13	15,38	2/2	100,0
Alpinópolis	1/5	20,0	1/1	100,0
Silvanópolis	1/7	14,28	1/1	100,0
Santa Catarina	1/1	100,0	1/1	100,0
Jaguaruna	1/1	100,0	1/1	100,0
Bahia	8/44	18,18	2/2	100,0
Campo Alegre	4/11	36,36	1/1	100,0
Itamarajú	4/33	12,12	1/1	100,0
Mato Grosso	3/20	15,0	1/1	100,0
Ipiranga do Norte	3/20	15,0	1/1	100,0

Evidenciou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre as idades (Tabela 3). O BCoV foi detectado principalmente em bezerros de até um 1 mês de idade [37.5%(3/8)]. Também foi demonstrada a incidência de BCoV em 11,11% (4/36) e 2,7% (1/36) em animais com idade variando de 6 a 15 meses. Amostras de bezerros na faixa etária de 4-5 meses não resultaram em positivas. Em 3 amostras positivas [7.89%(3/38)] não foi informada a idade na ficha de requisição.

Tabela 3. Distribuição das amostras positivas para BCoV de acordo com a faixa etária

Idade (meses)	Animais diarreicos (n/total)	%
1	3/8	37.5
2-3	7/27	25.9
4-5	0/3	0.0
6-15	4/36	11.11
Não identificado	3/38	7,89

* $p = 0,2925$ (Teste do X^2)

A Tabela 4 apresenta a caracterização das amostras quanto ao sistema de criação e exploração, e ao sexo dos animais. Embora a correlação entre o sexo e o tipo de criação não fosse estatisticamente significativa ($p > 0.05$) notou-se uma maior porcentagem de BCoV em fêmeas [(16,66%)6/36] e em bezerros de corte [22,45(9/40)]. Quanto ao tipo de exploração observou-se uma maior frequência de BCoV nos sistemas semi-intensivo [66,66%(2/3)] e extensivo [28,57%(6/21)].

Tabela 4. Frequência de positividade de BCoV em relação ao sexo e aos sistemas de criação e exploração

Variáveis	(n/total)	%	Valor de p
Sexo			
Macho	5/46	10,86	0,6178
Fêmea	6/36	16,66	
NI	6/32	18,75	
Criação			
Corte	9/40	22,45	0.2467
Leite	4/33	12,22	
NI	4/41	9,75	
Exploração			
Extensivo	6/21	28,57	0.001
Intensivo	5/25	20,0	
Semi-intensivo	2/3	66,6	
NI	4/65		

5.5 COMPARAÇÃO DAS TÉCNICAS DE RT-PCR E SEMI-NESTED PCR PARA O DIAGNÓSTICO DE BCoV

Em comparação aos resultados obtidos pelas técnicas de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR validadas, verificou-se uma maior sensibilidade diagnóstica da reação de *semi-nested* RT-PCR ($p < 0,05$).

Tabela 5. Comparação entre as técnicas de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR na detecção de BCoV

Teste	RT-PCR (% Pos/Total)	Semi- <i>nested</i> PCR (% Pos/Total)
Positivo	6/114 (5.26)	17/114 (14.91)
Negativo	108/114 (94.74)	97/114 (85.09)

$\chi^2 = 0,0156$ ($p < 0,05$)

5.6 NESTED RT-PCR DIRIGIDA A AMPLIFICAÇÃO DA SUBUNIDADE S1 DA PROTEÍNA S

A reação de *nested* RT-PCR dirigida ao gene codificador da subunidade S1 da glicoproteína S foi aplicada as 17 amostras positivas para BCoV pela reação de *semi-nested* RT-PCR para o gene N, resultando no fragmento esperado de 488 pb em 2 amostras, assim como para o controle positivo (Figura 20). O controle negativo utilizado não produziu quaisquer bandas.

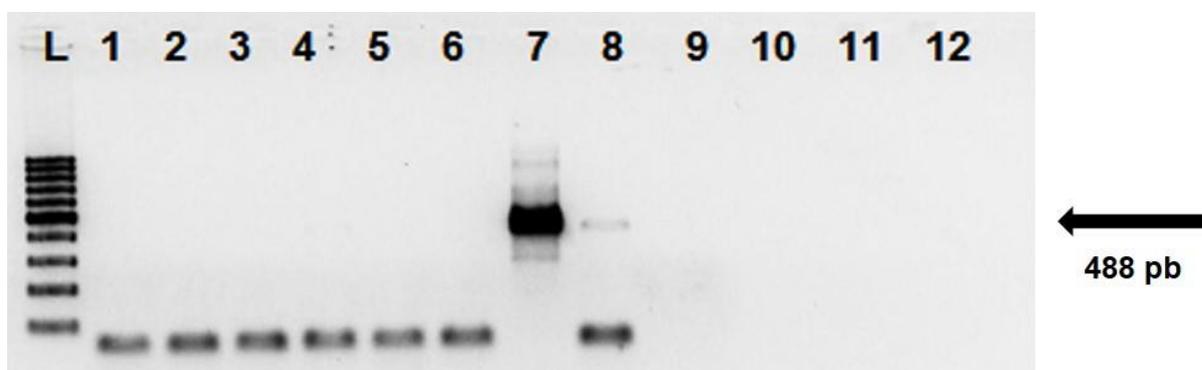


Figura 20: Eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com GelRed®(1:150) mostrando o fragmento esperado de 488 pb nos resultados da *nested* RT-PCR para o gene S. Coluna L: padrão de peso molecular (*ladder* 100pb); Colunas 1-16, 9-11: amostras fecais testadas; Coluna 7: controle positivo para BCoV (cepa Kakegawa); Coluna 12: controle negativo.

5.7 RT-PCR DIRIGIDA AO GENE S COMPLETO

Dentre as 17 amostras positivas para BCoV submetidas a uma RT-PCR para a amplificação completa do gene S, apenas 4 amostras obtiveram os fragmentos esperados para duas regiões alvos como é demonstrado no Quadro 11.

Quadro 11. Resultados da RT-PCR para os 7 pares de *primers* utilizados para a amplificação completa do gene codificador da proteína S do BCoV.

Identificação/Primers	Primer A	Primer B	Primer C	Primer D	Primer E	Primer F	Primer G
23286/12	N	N	N	N	N	N	N
18900/13	N	N	N	N	N	P++	N
15571/14	N	N	N	N	N	N	N
16688/14	N	N	N	N	N	N	N
1569/15	N	N	N	N	N	N	N
1570/15	N	N	N	N	N	N	N
1571/15	N	N	N	N	N	N	N
3684/15	N	P+	N	N	N	N	N
3688/15	N	N	N	N	N	N	N
3700/15	N	P+	N	N	N	N	N
12737/15	N	N	N	N	N	N	N
15235/15	N	N	N	N	N	N	N
15351/15	N	N	N	N	N	N	N
18304/15	N	P+	N	N	N	N	N
21185/15	N	N	N	N	N	N	N
21188/15	N	N	N	N	N	N	N
21195/15	N	N	N	N	N	N	N
Controle positivo	P	P+	P	P	P	P	P
Controle negativo	N	N	N	N	N	N	N

*N= Negativo; P+= positivo fraco; P++=Positivo forte

5.7 HEMI-NESTED RT-PCR DIRIGIDA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE CODIFICADOR DA PROTEÍNA HE

As 17 amostras positivas para BCoV também foram testadas para uma reação de *hemi-nested* RT-PCR dirigida a proteína HE, as quais não apresentaram o fragmento específico.

5.8 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE GENEALÓGICA

Doze dentre as 17 amostras positivas para semi-*nested* RT-PCR para o gene N e 4 amostras positivas para a RT-PCR para o gene S (subunidades S1 e S2) foram selecionadas para a reação de sequenciamento como está representado no Quadro 12.

Quadro 12. Amostras positivas para BCoV para os genes N e S submetidas ao sequenciamento de DNA.

Identificação	Ano	Genes	Distribuição geográfica
23286	2012	N	Alpinópolis – MG
18900	2013	N e S	Eldorado – SP
15571	2014	N	Silvanópolis – MG
3684	2015	N e S	Itamarajú – BA
3688	2015	N	Itamarajú – BA
3700	2015	N e S	Campo Alegre – BA
15235	2015	N	Campo Alegre – BA
15351	2015	N	Itamarajú – BA
18304	2015	N e S	Pindamonhangaba – SP
21185	2015	N	Ipiranga do Norte – MT
21188	2015	N	Ipiranga do Norte – MT
21195	2015	N	Ipiranga do Norte – MT

Para o gene N obteve-se sequências nucleotídicas viáveis para 8 amostras com o score Phred ≥ 20 para as amostras: 18900/13; 15571/14; 3688/15; 3700/15; 15235/15; 18304/15; 21185/15 e 21188/15. Entretanto para o gene S, as amostras 18900/13; 3684/15; 3700/15 e 18304/15 não resultaram em sequências viáveis para a análise genealógica. A análise das sequências para o gene N por *BLAST/n* confirmou a identidade das mesmas, sendo que esta análise não produziu sequências não homólogas para o gene em questão.

O percentual de identidade de nucleotídeos entre as amostras do presente estudo e as sequências brasileiras depositadas no *GenBank* variou de 95,3 a 97,2%. Comparando-se as 8 amostras de BCoV aqui sequenciadas, a identidade de nucleotídeos foi de 97,6 a 100%.

Os menores percentuais de identidade referiram-se as amostras provenientes do Mato Grosso (97,6 a 99,6%), enquanto as sequências dos demais Estados brasileiros analisados apresentaram 100% de identidade.

Em relação a sequências nucleotídicas oriundas de outros países, constatou-se uma elevada identidade entre as amostras sequenciadas neste estudo (97,2 a 99,6%) com amostras derivadas da Coreia (BC94, A3 e SUN5) e do Japão (Kakegawa). Os demais resultados de identidade de nucleotídeos entre as 24 sequências avaliadas encontra-se na Tabela 6.

O alinhamento de nucleotídeos apresentado na Figura 21 demonstrou substituições em 9 posições, sendo 6 posições exclusivas para as amostras 21185/15 e 21188/15. Como demonstrado na Figura 22 foram observadas substituições de aminoácidos nas posições 4, 28, 45 e 78 do alinhamento, sendo que duas substituições: de Alanina (A) para Treonina (T) e Tirosina (Y) para Fenilalanina (F) foram exclusivas para a amostra deste estudo.

A árvore de máxima verossimilhança de sequências de nucleotídeos para as 8 amostras de BCoV resultou em 3 *clusters* parafiléticos e politômicos para o gene N (Figura 23).

O *cluster* 1 constituiu-se de amostras brasileiras originárias dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, juntamente com sequências americanas (DB2 e LUN), francesas (Caen 13 e 14) e chinesa (YC) com o valor de *bootstrap* de 69.

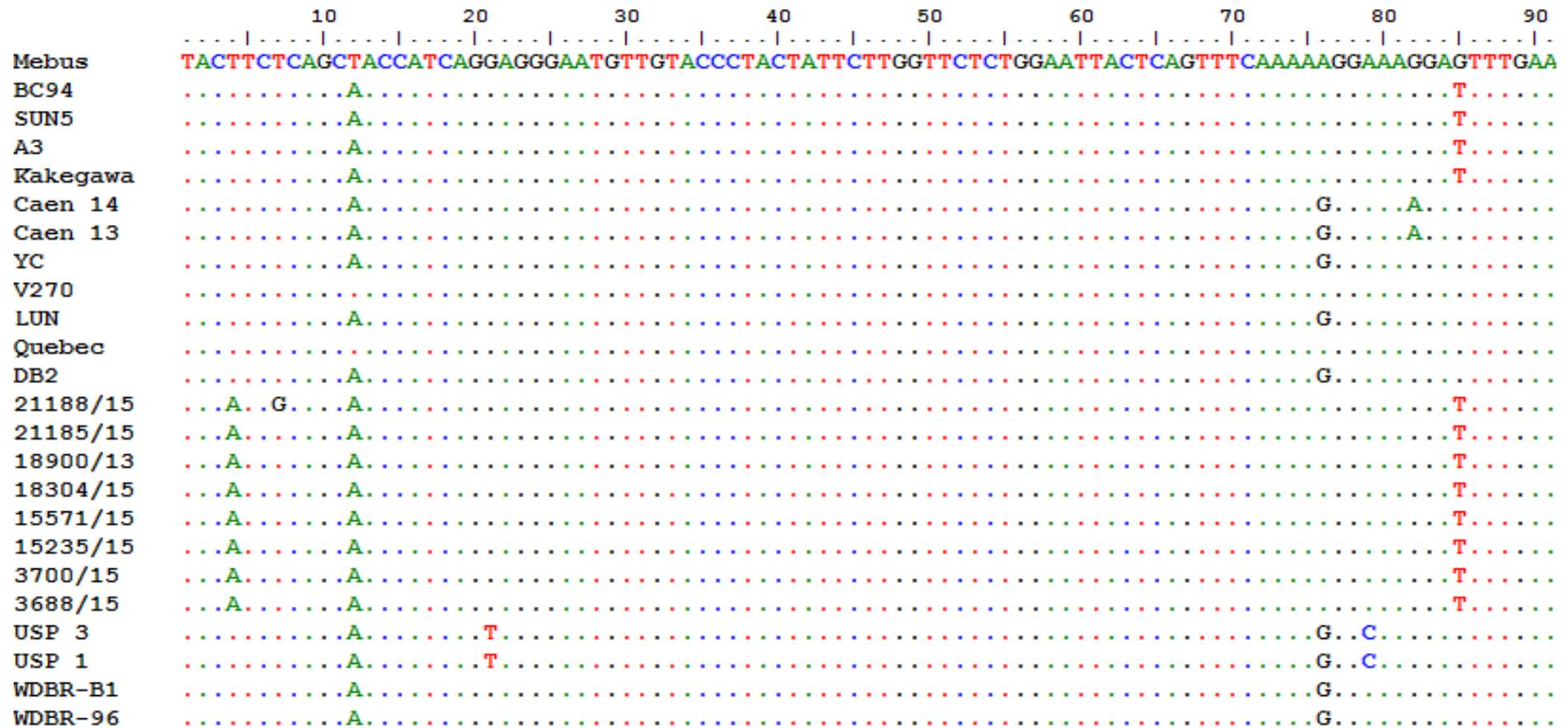
O *cluster* 2 foi formado por sequências de BCoV dos EUA (Mebus), Canadá (Quebec) e da Alemanha (V270) com *bootstrap* de 67. As amostras deste estudo agregaram-se no *cluster* 3 com o valor de *bootstrap* de 66 juntamente com sequências oriundas da Coreia e do Japão.

Com relação à idade do hospedeiro, as sequências de BCoV correspondentes a bezerros e vacas adultas segregaram juntamente com as amostras incluídas neste estudo, demonstrando que não haver a existência de marcadores moleculares para esta variável.

Tabela 6. Percentual de identidade entre BCoV com base na sequência de nucleotídeos do gene N

	Mebus	BC94	SUN5	A3	Kakegawa	Caen 14	Caen 13	YC	V270	LUN	Quebec	DB2	21188/15	21185/15	18900/13	18304/15	15571/15	15235/15	3700/15	3688/15	USP 3	USP 1	WDBR-B1	WDBR-96	
Mebus	ID	99,2	99,2	99,2	98,8	98,4	98,4	98,8	100	98,4	100	98,4	96,8	98,4	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	97,6	98	98	98	
BC94	99,2	ID	100	100	99,6	98,4	98,4	98,8	99,2	98,4	99,2	98,4	97,6	99,2	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	97,6	98	98	98
SUN5	99,2	100	ID	100	99,6	98,4	98,4	98,8	99,2	98,4	99,2	98,4	97,6	99,2	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	97,6	98	98	98
A3	99,2	100	100	ID	99,6	98,4	98,4	98,8	99,2	98,4	99,2	98,4	97,6	99,2	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	97,6	98	98	98
Kakegawa	98,8	99,6	99,6	99,6	ID	98	98	98,4	98,8	98	98,8	98	97,2	98,8	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	99,2	97,2	97,6	97,6	97,6
Caen 14	98,4	98,4	98,4	98,4	98	ID	100	98,8	98,4	99,2	98,4	99,2	96	97,6	98	98	98	98	98	98	98,4	98	98,8	98,8	
Caen 13	98,4	98,4	98,4	98,4	98	100	ID	98,8	98,4	99,2	98,4	99,2	96	97,6	98	98	98	98	98	98	98,4	98	98,8	98,8	
YC	98,8	98,8	98,8	98,8	98,4	98,8	98,8	ID	98,8	98,8	98,8	98,8	96,04	98	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98,4	98	98,4	98,4	98,4	
V270	100	99,2	99,2	99,2	98,8	98,4	98,4	98,8	ID	98,4	100	98,4	96,8	98,4	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	97,6	98	98	98	
LUN	98,4	98,4	98,4	98,4	98	99,2	99,2	98,8	98,4	ID	98,4	100	96	97,6	98	98	98	98	98	98	99,2	98,8	99,6	99,6	
Quebec	100	99,2	99,2	99,2	98,8	98,4	98,4	98,8	100	98,4	ID	98,4	96,8	98,4	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	98,8	97,6	98	98	98	
DB2	98,4	98,4	98,4	98,4	98	99,2	99,2	98,8	98,4	100	98,4	ID	96	97,6	98	98	98	98	98	98	99,2	98,8	99,6	99,6	
21188/15	96,8	97,6	97,6	97,6	97,2	96	96	96,04	96,8	96	96,8	96	ID	97,6	98	98	98	98	98	98	0,953	0,957	0,957	0,957	
21185/15	98,4	99,2	99,2	99,2	98,8	97,6	97,6	98	98,4	97,6	98,4	97,6	97,6	ID	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	99,6	96,8	97,2	97,2	97,2	
18900/13	98,8	99,6	99,6	99,6	99,2	98	98	98,4	98,8	98	98,8	98	98	99,6	ID	100	100	100	100	100	97,2	97,6	97,6	97,6	
18304/15	98,8	99,6	99,6	99,6	99,2	98	98	98,4	98,8	98	98,8	98	98	99,6	100	ID	100	100	100	100	97,2	97,6	97,6	97,6	
15571/15	98,8	99,6	99,6	99,6	99,2	98	98	98,4	98,8	98	98,8	98	98	99,6	100	100	ID	100	100	100	97,2	97,6	97,6	97,6	
15235/15	98,8	99,6	99,6	99,6	99,2	98	98	98,4	98,8	98	98,8	98	98	99,6	100	100	100	ID	100	100	97,2	97,6	97,6	97,6	
3700/15	98,8	99,6	99,6	99,6	99,2	98	98	98,4	98,8	98	98,8	98	98	99,6	100	100	100	100	ID	100	97,2	97,6	97,6	97,6	
3688/15	98,8	99,6	99,6	99,6	99,2	98	98	98,4	98,8	98	98,8	98	98	99,6	100	100	100	100	100	ID	97,2	97,6	97,6	97,6	
USP 3	97,6	97,6	97,6	97,6	97,2	98,4	98,4	98	97,6	99,2	97,6	99,2	95,3	96,8	97,2	97,2	97,2	97,2	97,2	97,2	ID	99,6	98,8	98,8	
USP 1	98	98	98	98	97,6	98	98	98,4	98	98,8	98	98,8	95,7	97,2	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	99,6	ID	98,4	98,4	
WDBR-B1	98	98	98	98	97,6	98,8	98,8	98,4	98	99,6	98	99,6	95,7	97,2	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	98,8	98,4	ID	100	
WDBR-96	98	98	98	98	97,6	98,8	98,8	98,4	98	99,6	98	99,6	95,7	97,2	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	97,6	98,8	98,4	100	ID	

Figura 21: Alinhamento de nucleotídeos um segmento de 256pb do gene codificador da proteína N, tendo a amostra Mebus de BCoV como referência.



Continua

	210	220	230	240	250
Mebus	AGCGTCAACTGCTGCCACGATGGTATTTTTACTATCTTGGAACAGGACCGCATGCC				
BC94
SUN5
A3
Kakegawa
Caen 14	T.....
Caen 13	T.....
YC	G.....
V270
LUN	T.....
Quebec
DB2	T.....
21188/15	G.....	A.....	T.....
21185/15
18900/13
18304/15
15571/15
15235/15
3700/15

Conclusão

Figura 22: Alinhamento de um segmento de 76 aminoácidos do gene codificador da proteína N, tendo a amostra Mebus de BCoV como referência.

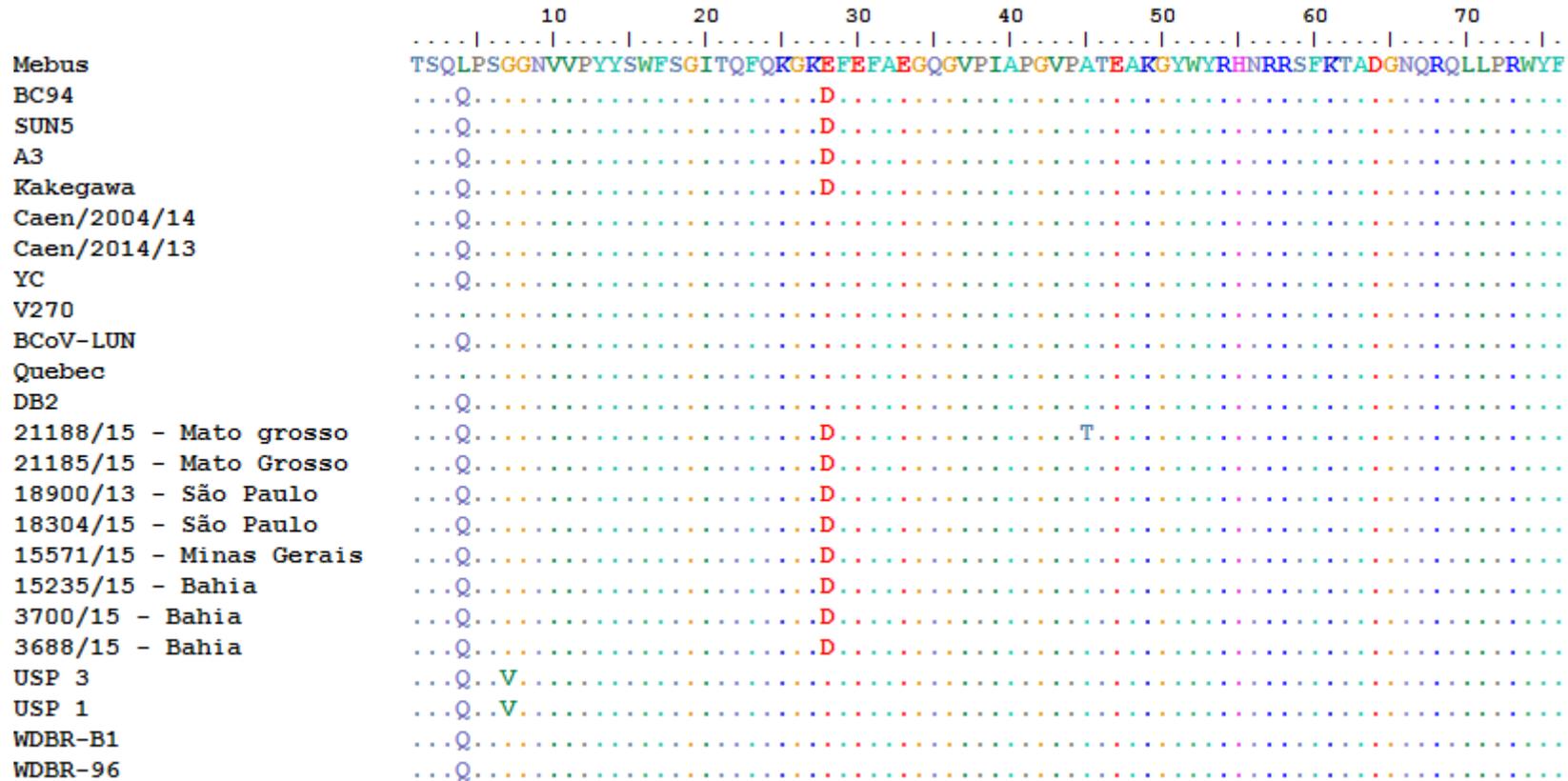
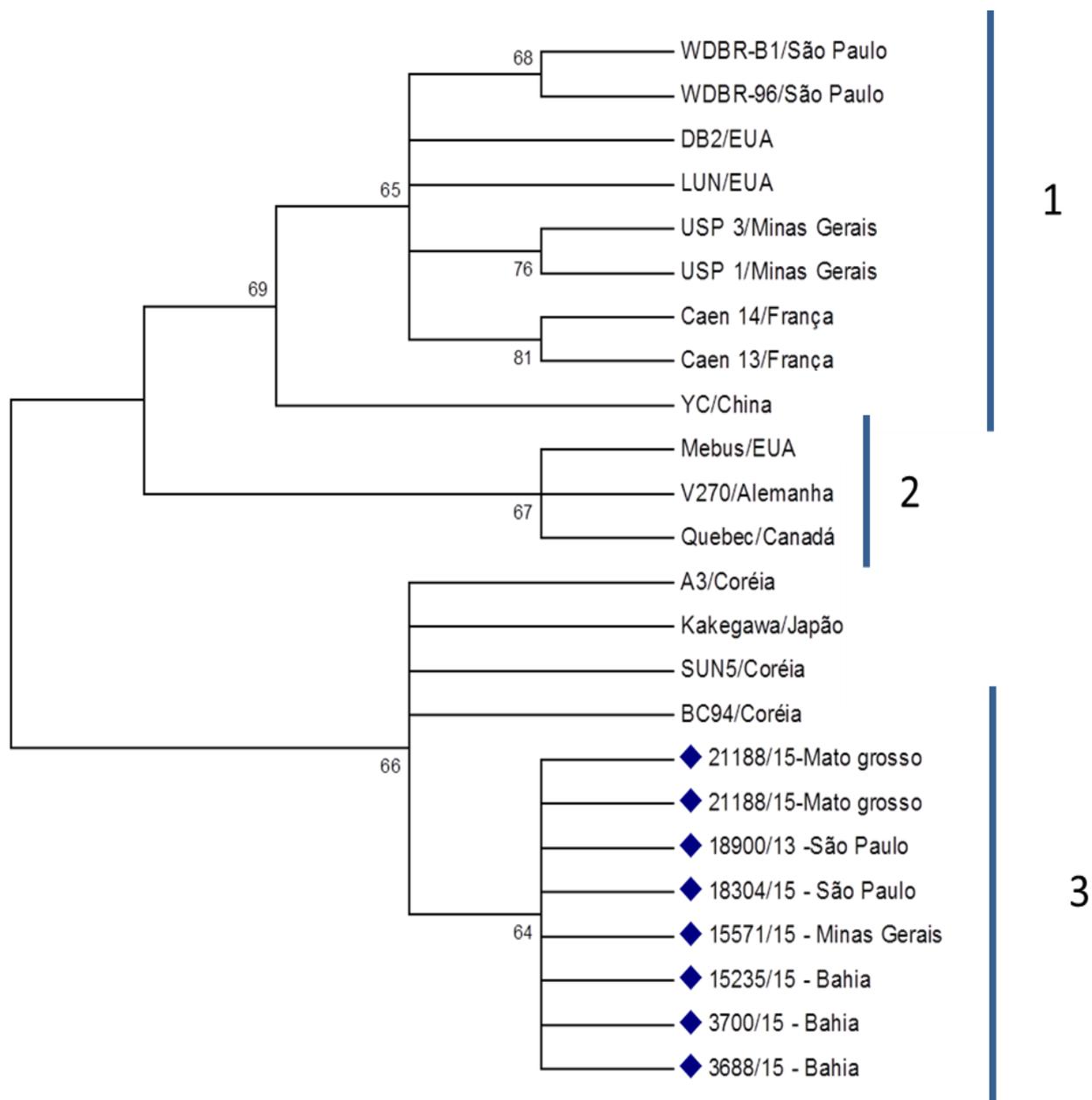


Figura 23: Árvore genealógica não enraizada construída pelo critério de máxima verossimilhança, modelo evolutivo Jukes-Cantor parâmetros para sequências nucleotídicas do gene codificador da proteína N. Em azul as amostras do presente estudo



6. DISCUSSÃO

As diarreias constituem uma enfermidade mórbida de distribuição mundial, sendo o BCoV uma das principais causas de gastroenterites em animais jovens (BUZINARO et al, 2000).

A análise da diversidade genética do BCoV através da caracterização e distribuição de genótipos/sorotipos e sua evolução, vem sendo primordial para o estabelecimento de ações epidemiológicas. Para tanto, é necessário o desenvolvimento de técnicas suficientemente sensíveis e específicas para o diagnóstico viral.

Diversos trabalhos envolvendo métodos moleculares para o diagnóstico de BCoV vem sendo publicados. Entretanto a inexistência de técnicas que possam ser consideradas padrão-ouro ou de *kits* comercialmente disponíveis dificulta a comparação entre os resultados laboratoriais.

Primeiramente optou-se por otimizar e validar uma reação de semi-nested RT-PCR dirigida ao gene N para detecção de BCoV, posto que a semi-nested RT-PCR descrita por Asano et al. (2010) ao ser testada em amostras previamente positivas, seja de referência ou de campo resultou no aparecimento de várias bandas inespecíficas, demonstrando uma baixa reprodutibilidade do protocolo e a necessidade de ajuste da reação.

Para a otimização e validação da reação de semi-nested RT-PCR foram utilizados *primers* preconizados por Asano et al. (2010) para a amplificação do gene que codifica a proteína N. Esta proteína tem sido amplamente utilizada no diagnóstico molecular dos BCOVs por diversos autores, uma vez que é bastante conservada e é expressa em grandes quantidades durante a replicação viral (TAKIUCHI et al., 2006; LOA et al., 2006).

A seguir, avaliou-se a temperatura ótima de transcrição reversa e sua influência na especificidade da reação. Os resultados obtidos demonstraram não haver uma diferença significativa entre as temperaturas de transcrição reversa testadas, tendo em vista que a reação produziu fragmentos específicos e inespecíficos semelhantes. Sabe-se que em altas temperaturas ($\geq 55^{\circ}\text{C}$) o rendimento da enzima transcriptase na síntese de c-DNA é menor em comparação as temperaturas menores, minimizando a sensibilidade da técnica (KENNEDY; OSWALD, 2011).

Após esta etapa foram testadas diferentes temperaturas de hibridização dos *primers* para a primeira e segunda amplificação. Em ambas as reações à temperatura de 50.2°C foi considerada a ideal por não formar bandas inespecíficas na primeira amplificação e por produzir uma quantidade menor de bandas inespecíficas durante a segunda amplificação, o que é crucial para a eficiência das amplificações e reações de sequenciamento de DNA.

Para determinar a sensibilidade da técnica e avaliar a interferência de elementos inibitórios foi realizada uma diluição seriada na base 10 da amostra padrão Kakegawa, tendo PBS e suspensão fecal a 20% como diluentes. Constatou-se que os limiares de detecção variaram de acordo com o diluente utilizado. Para a primeira e a segunda amplificação, as diluições em suspensões fecais apresentaram uma sensibilidade superior (10^{-7}) quando comparadas as diluições em PBS (10^{-3}). Resultados similares foram descritos por Takiuchi et al. (2006), Asano et al. (2008) e Asano et al. (2010) que obtiveram amplificações de BCoV em suspensões fecais até a 10^{-7} diluição.

Teoricamente este resultado pode ser explicado pelo fato de que quanto maior a concentração do RNA total de uma amostra, maior é seu efeito carreador, tornando a extração mais eficiente. Este efeito carreador só é válido para métodos de extração que dependem da precipitação do RNA. Outros métodos podem reproduzir resultados controversos (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

As fezes contêm substâncias que inibem a ação da enzima Taq polimerase, determinando resultados falso-negativos. Entre as principais substâncias que interferem na reação da PCR estão: sais biliares, complexos de polissacarídeos e bilirrubina. No presente estudo, pode-se inferir que substâncias inibidoras não interferiram na amplificação do gene alvo, tendo em vista que a sensibilidade analítica foi maior quando suspensões fecais foram utilizadas como diluente, conforme já mencionado.

Outro ponto a ser destacado foi à presença de bandas inespecíficas abaixo do fragmento esperado nas diluições mais altas. A concentração em excesso de *primers* possibilita a amplificação de produtos inespecíficos e a formação de dímeros de primers (KENNEDY; OSWALD, 2011). Para contornar este problema foram testadas várias concentrações de *primers*. Os *primers* BCOV1 + BCOV2 e BCOV1+BCOV3 a 0,2 mM produziram resultados satisfatórios, eliminando os fragmentos inespecíficos e mantendo o limiar de detecção descrito anteriormente.

A partir do protocolo estabelecido por Asano et al. (2010) diversos ajustes foram realizados durante a otimização. Neste estudo utilizaram-se diferentes temperaturas de transcrição reversa e de hibridização na primeira e segunda amplificação com o intuito de estabelecer uma maior especificidade à reação. Diferentemente de Asano et al. (2010), a transcrição reversa e a primeira amplificação da reação aqui desenvolvida foram realizadas em uma única etapa (RT-PCR *one step*).

Outra alteração proposta para as reações de RT-PCR e semi-*nested* foi a utilização de uma *Master Mix*, uma solução pronta para uso contendo dNTPs, DTT, Taq polimerase, cloreto de magnésio e tampões de reação. Entre as vantagens da técnica de semi-*nested* RT-PCR para o gene N otimizada está à redução do tempo de preparo das reações e nas

chances de contaminação, tornando a técnica mais simples e prática, além do custo-benefício.

Apesar das reações de RT-PCR e semi-*nested* PCR apresentarem o mesmo limiar de detecção, verificou-se uma diferença significativa de positividade ($p > 0,05$) entre as técnicas em relação às amostras de campo analisadas. Uma explicação plausível para a diferença de detecção de BCoV deve-se a uma maior especificidade da reação de semi-*nested*, uma vez que são utilizados *primers* que amplificam regiões internas ao produto da primeira PCR. Além disso, os *primers* utilizados na reação de semi-*nested* PCR já foram demonstrado como específicos, o que pode ser confirmado pelo sequenciamento, descartando assim a hipótese de interferência de falso-positivos.

A semi-*nested* RT-PCR otimizada foi aplicada a 114 amostras fecais de bezerros, detectando BCoV em 14,91% (17/114) das amostras individuais e em 56,25% (9/16) dos rebanhos bovinos. Foram considerados como positivos os rebanhos que tivessem ao menos um caso de infecção por BCoV, independentemente da manifestação clínica.

A frequência de BCoV encontrada foi inferior a média nacional, que varia de 19,8% a 33,3% (JEREZ et al., 2002; LORENZETI et al., 2013; STIPP et al., 2009; COURA et al., 2015). A diminuição do percentual de ocorrência de BCoV é possivelmente atribuído às amostras analisadas nos estudos acima citados, que incluíam em sua maior parte fezes de neonatos e bezerros diarreicos. Vale ressaltar que no presente trabalho também foram avaliadas fezes de bezerros assintomáticos, correspondendo a 61,40% (70/114) da amostragem total, o que poderia contribuir para tais resultados.

Quanto à sintomatologia, verificou-se a presença de coronavírus tanto em bezerros com sinais clínicos de diarreia assim como em bezerros assintomáticos. Este achado é compatível com diversos estudos que relatam BCoV em quadros diarreicos, em bovinos (HECKERT; SAIF; AGNES, 1990; SAIF, 2010). Atendo-se que neste estudo não foi realizado um diagnóstico diferencial, podendo as manifestações clínicas entéricas estar relacionadas também a outros patógenos.

A constatação de BCoV em 10% (10/70) dos bezerros assintomáticos, ou seja portadores, indica que estes animais possam atuar como fonte de infecção para animais susceptíveis (JEREZ et al., 2009; STIPP et al., 2009).

Em relação à distribuição geográfica, demonstrou-se a ocorrência de BCoV nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Bahia e Mato grosso, indicando que os coronavírus estejam disseminados nos rebanhos bovinos brasileiros. Este estudo também apresenta os primeiros relatos da circulação de BCoV nos estados de Santa Catarina, da Bahia bem como da região nordeste.

A prevalência de BCoV em São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso corroboram com os trabalhos realizados por Barry et al. (2009), Stipp et al. (2009), Lorenzetti et al. 2013 e Coura et al. (2015). Apesar da análise em única amostra do Estado de Santa Catarina, esta foi positiva, por esse motivo alerta-se para realização de pesquisas com amostragem maior para avaliar a situação de BCoV no rebanho deste estado.

A incidência de BCoV foi maior em animais com até 1 mês de idade, compatível aos resultados encontrados por Coura et al. (2015) e Reynolds et al. (1986) que reportam a prevalência de coronavírus em bezerros com 1 a 60 dias de idade. Pode também ser observado no presente estudo a ocorrência de BCoV em amostras diarreicas de animais na faixa etária de 6 a 15 meses, fato este discrepante da idade consenso, no entanto demonstrando que animais entre 6 a 15 meses são susceptíveis a infecção por coronavírus.

Embora não tenha sido encontrada uma relação estatística entre a detecção de BCoV e o sistema de criação, evidenciou-se uma maior porcentagem de casos positivos em rebanhos de corte. Inicialmente estes resultados podem ser atribuído a práticas de manejo reprodutivo aplicadas em propriedades de corte, permitindo uma grande quantidade de nascimentos durante a estação da chuva, ou seja, em curto período de tempo, o que contribuiria para a disseminação do BCoV (BARRY et al., 2009). Esta afirmação, entretanto requer muita precaução dado o número de amostras analisadas (n=114), mas chama a atenção para mais estudos comparando a frequência de BCoV em rebanhos bovinos leiteiros e de corte.

A taxa de BCoV foi relativamente superior em fêmeas em comparação aos machos, em 16,66% e 10,86% das amostras respectivamente. Em um inquérito soropidemiológico realizado em rebanhos bovinos na Coreia, Yang et al.(2007) também observaram um maior proporção de anticorpos anti-BCoV em fêmeas.

Constatou-se também um elevado percentual de ocorrência de coronavírus em sistemas extensivos e semi-intensivos de exploração. Porém vale ressaltar, que a amostragem obtida em sistemas semi-intensivos não foi significativa (n=3). A análise de algumas variáveis como idade, sexo e sistema de exploração foram prejudicadas, devido a falta de informações.

Dentre as 17 amostras positivas para *semi-nested* RT-PCR dirigida ao gene N, apenas 2 amostras foram positivas para o gene codificador da região hipervariável da subunidade S1.

Para a PCR direcionada a amplificação completa do gene S, foram observados fragmentos em quatro amostras, sendo que para três amostras foram obtidos *amplicons* para um segmento da subunidade S1 e em uma amostra para um segmento da subunidade S2. Enquanto que para o gene HE as amostras não resultaram no produto específico.

Uma das possibilidades para tais discrepâncias entre as técnicas de PCR para os genes N, S1, S e HE pode ser atribuída às características de cada gene alvo. Sendo assim, a variabilidade nucleotídica inerente à proteína S impediria a hibridização dos *primers* à sequência-alvo. O gene HE tem demonstrado ser conservado entre amostras brasileiras de BCoV, levando a crer que a ausência de hidridização dos *primers* seja uma hipótese pouco provável.

Além disso, deve-se considerar entre outros fatores a ocorrência de falhas durante a execução da reação tais como a perda de RNA viral durante as etapas de extração e transcrição reversa, degradação das partículas virais e /ou genoma viral devido aos sucessivos congelamentos e descongelamentos das amostras. Pode-se também deduzir que baixa sensibilidade das PCRs descritas por Brandão et.al (2006), Hasoksuz et.al (2002) e Souza et.al (2010) para os genes codificadores das proteínas S e HE em comparação a PCR dirigida ao gene N padronizada neste estudo, tenha contribuído para resultados falso-negativos.

Desta forma, a otimização das reações de PCR através diferentes temperaturas de anelamento e de concentrações de RNA, c-DNA e reagentes, permitiriam a amplificação dos genes S1, S e HE em número maior de amostras.

A identidade de nucleotídeos com base na sequência parcial do gene N dos BCoVs entre as amostras brasileiras sequenciadas neste estudo foram elevadas (97,6 a 100%). As sequências originárias dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Bahia demonstraram 100% de identidade. Os menores percentais de identidade (97,6%) corresponderam às amostras originárias do Estado do Mato Grosso.

Ao comparar as sequências de BCoV para o gene N aqui analisadas com sequências obtidas no *GenBank*, verificou-se uma elevada identidade de nucleotídeos com as amostras provenientes da Coréia e do Japão. Entretanto notou-se também que a identidade com relação às amostras brasileiras foi menor (95,3 a 97,2%).

A árvore de máxima verossimilhança para nucleotídeos para o gene N demonstrou que as amostras do presente estudo divergiram de outras amostras de BCoV já descritas no Brasil, evidenciando a existência de 2 genótipos entre as amostras brasileiras. Pode-se observar que as amostras brasileiras aqui analisadas agruparam-se com amostras da Ásia.

Uma justificativa plausível para a convergência de sequências derivadas de países tão distantes deve-se ao fato de que a maioria das amostras contidas neste *cluster* foram isoladas em cultivos celulares antes de serem sequenciadas. O isolamento em cultivo celular previamente ao sequenciamento exerce uma seleção artificial, induzindo a uma evolução convergente entre diferentes amostras (BORUCKI et al., 2013).

Através da análise genealógica das sequências de nucleotídeos para o gene N, foram identificadas mutações exclusivas de nucleotídeos e aminoácidos para as amostras deste estudo, provenientes do Estado do Mato Grosso.

Com base nestes dados, pode-se inicialmente inferir que determinado evento evolutivo, deleções e/ou inserções, tenham dado a origem a 2 ou mais genótipos de BCoV que se disseminaram por diversos países, o que é condizente com algumas descrições prévias.

Lojkic et al. (2015) verificaram que amostras positivas para BCoV em amostras fecais de bezerros na Croácia, segregaram em dois clusters distintos com base no gene N.

No Brasil, Barros et al. (2013) e Lorenzetti et al. (2015) observaram através da análise filogenética do gene N de BCoV em bezerros com quadros diarreicos provenientes das regiões sul, sudeste e centro-oeste, agruparam-se em 2 *clusters*.

Estas informações sugerem uma concordância entre as topologias das árvores entre sequências do gene codificador da proteína N descritas na literatura e do presente estudo. Contudo, nota-se um baixo número de sequências publicadas em relação ao gene N, o que pode levar a interpretações superficiais.

Outra provável hipótese está relacionada à distribuição geográfica e temporal, diferentes tipos de raças e sistemas de criação, o comércio de animais, exercendo assim uma pressão seletiva sobre o gene N.

Interessantemente, amostras brasileiras de BCoV em bezerros agruparam-se com animais adultos, independente da localização geográfica, demonstrando um grande identidade entre BCoV associados a diarreia neonatal e a disenteria de inverno. Fato este concordante a relatos prévios que apontam a existência de padrões filogeográficos e de que não há diferença com a idade dos hospedeiros, o que justifica a rápida disseminação de BCoV dentro de um rebanho antes mesmo que se acumulem mutações.

O caráter politômico dos *clusters* identificados nas amostras do presente estudo nos leva a três tipos de interpretações: A primeira refere-se à ocorrência de múltiplos eventos de especiações, tendo em vista os mecanismos de evolução episódica dos coronavírus através da qual linhagens de BCoV divergiram em um curto período de tempo da população inicial.

A segunda hipótese diz respeito à falta de informação sobre de como as linhagens estão relacionadas, uma vez que a proteína N é bastante conservada, estando menos propensa a detecção de polimorfismos tais como as proteínas S e HE. Assim, a análise conjunta dos genes S, HE poderiam apresentar uma genealogia mais resolvida, o que não foi possível neste estudo. Deve-se também considerar o fato de que as linhagens de BCoV encontradas neste estudo são de alta infectividade.

A existência de diferentes genótipos de BCoV possui uma implicação direta nos métodos de diagnósticos baseados em biologia molecular, assim como na produção de vacinas. Entretanto, torna-se evidente que a análise de um único gene pode não ser suficiente para a complexa tarefa de definir as relações evolutivas entre diferentes linhagens de coronavírus em bovinos. Desta forma, estudos continuados visando a caracterização completa do genoma permitirá uma compreensão mais detalhada da epidemiologia molecular do BCoV.

7. CONCLUSÃO

- No presente estudo pode-se otimizar e validar as técnicas de RT-PCR e *semi-nested* RT-PCR dirigida ao gene N para a detecção de BCoV.
- A reação de *semi-nested* PCR mostrou-se mais sensível no diagnóstico do BCoV em relação a RT-PCR.
- A infecção por BCoV pode ser verificada tanto em neonatos quanto em bovinos jovens (garrotes e novilhas), apresentando ou não manifestação clínica.
- A infecção por BCoV foi maior em rebanhos de corte do que em rebanhos leiteiros.
- A detecção do BCoV nos Estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Mato Grosso, São Paulo e Bahia evidenciam que este vírus está disseminado no Brasil.
- Não houve diferenciação entre linhagens de BCoV provenientes de bezerros e animais adultos com base na sequência do gene N.
- A análise genealógica da sequência do gene codificador da proteína N, mostrou que as amostras brasileiras de BCoV segregaram em 2 *cluster* distintos, sendo as amostras do presente estudo foram estreitamente relacionadas a amostras asiáticas.

8. REFERÊNCIAS

- 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.
- ALEKSEEV, K.P.; VLASOVA, A.N.; JUNG, K.; HASOKSUZ, M.; ZHANG, X.; HALPIN, R.; WANG, S.; GH ELDIN, E.; DAVID, S.; SAIF, L.J. Bovine-Like Coronaviruses Isolated from Four Species of Captive Wild Ruminants Are Homologous to Bovine Coronaviruses, Based on Complete Genomic Sequences. **Journal of Virology**, v.82, n.24, p.12422-12431. 1983.
- AN, S.; CHEN, C.H.; 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.
- ASADI, H.A.; BAGHINEZHAD; ASADI, H. Neonatal calf diarrhea by rotavirus and coronavirus: a review. **International Journal of Bioscience**, v.6, n.2, p.230-236, 2015.
- ASANO, K.M.; SOUZA, S.P.; SILVA, S.O.S.; RICHTZEHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Rapid detection of bovine coronavirus by a semi-nested RT-PCR. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.11, p.869-873, 2009.
- ASANO, K.M.; SOUZA, S.P.; de BARROS, I.N.; AYRES, G.R.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Multiplex semi-nested RT-PCR with exogenous internal control for simultaneous detection of bovine coronavirus and group A rotavirus. **Journal Virology Methods**. v.169, n.2, p.375-379, 2010.
- ATHANASSIOUS, R.; MARSOLAIS, G.; ASSAF, R.; DEA, S.; DESCOTEAUX, 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. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 163-169, 1994.
- BARIC, R.S.; NELSON, C.W.; FLEMING, J.O.; DEANS, R.J.; KECK, J.G.; CASTEEL, N.; STOHRMAN, S.A. Interactions between coronavirus nucleocapsid protein and viral RNAs: Implication for viral transcription. **Journal of virology**, v.62, n.11, p.4280-4287, 1988.
- BARRERA, M.V.; RODRIGUEZ, E.B.; BETANCOURT, A.M.; FRIAS, M.T.L.; BRANDÃO, P.E. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in winter dysentery outbreak. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.4, n.3, p.221-224 2006.
- BARROS, N.I.; SILVA, S.O.S.; NETO, F.S.N.; ASANO, K.M.; SOUZA, S.P.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. A Multigene Approach for Comparing Genealogy of Betacoronavirus from Cattle and Horses. **The Scientific World Journal**, v.2013, p.1-6, 2013.
- BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; STIPP, D.T.; ALFIERI, A.A. Bovine coronavirus detection in a collection of diarrheic stool samples positive for group a bovine rotavirus. **Brazilian archives biology technology**, v.52, p.45-49, 2009.
- BAUGMGARTNER, W. Diarrhea in calves and young cattle. **Lucrări Științifice**, v.57, p.19-22, 2012

- BIDOKHITI, M.R.M; TRAVÉN, M; KRISHNA, N.K; MUNIR, M; BELÁK, S; ALENIUS, S; CORTNEY, M. Evolutionary dynamics of bovine coronaviruses: natural selection pattern of the spike gene implies adaptative evolution of the strains. **Journal of General Virology**, 94, n.9, p.2036-2049, 2013.
- BOLIEAU, M.J; KAPIL,S. Bovine coronavirus associated syndromes. **The veterinary clinics of North America, Food Animal Practice**, v.26, n.1, p.123-146, 2010.
- BOK, M; MIÑO, S; RODRIGUEZ, D; BADARACCO, A; NUNES, I; SOUZA, SP; GALARZA, R; VEJA, C; ODEAN, A; SAIF, L.J; PARREÑO, V. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994-2010. **Veterinary microbiology**, v.181, n.3, p.221-229, 2015.
- BORUCKI,M.K; ALLEN, J.E; CHEN-HARRIS, H; ZEMLA, A; VANIER,G; MABERY, S. TORRER, C; HULLINGER, P; SLEZAK, T. The Role of Viral Population Diversity in Adaptation of Bovine Coronavirus to New Host Environments. **PLOS ONE**, v.8, n.1, p.1-11, 2013.
- BRANDÃO, P.E; BIRGEL JR, E.H; GREGORI, F; ROSALES, C.A.R; RUIZ, V.L.A; JEREZ,J.A. Bovine coronavirus detection in adults cows in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n.2, p.103-104, 2002.
- 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. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003a.92p.
- BRANDÃO, P.E; GREGORI, F; MONTELEONE, G.S; SOARES, R.M; ROSALES, C.A.R. JEREZ, J.A. A Nested PCR assay for detection of bovine coronavirus S1 gene. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.1, p.1-3,2003b.
- BRANDÃO, P. E.; GREGORI, F ; RICHTZENHAIN, L J ; ROSALES, C A R ; VILLARREAL, L Y B ; JEREZ, J A . Molecular diversity of Brazilian strains of bovine coronavirus (BCoV) reveals a deletion within the hypervariable region of the S1 subunit of the spike glycoprotein also found in human coronavirus OC43. **Archives of Virology**, , v. 151, n. 9, p. 1735-1748, 2006.
- BRANDÃO, P.E; VILLARREAL, L.Y.B; SOUZA, S.P; RICHTZEHAIN, L.J; JEREZ, J.A. Mixed infection by bovine coronavirus, rotavirus, and cryptosporidium parvum in an outbreak of neonatal diarrhea in beef cattle. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.1, p.33-34, 2007.
- BUZINARO, M.G; MUNFORD, V; BRITO, V.M.E.D; RACZ,M.A; JEREZ,J.A. Caracterização eletroforetica e análise de subgrupo de rotavírus em rebanhos bovinos leiteiro do Estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.6, 2000.
- CAMPBELL, S.G; COOKINGHAM, C.A. The enigma of winter dysentery. **Cornel Veterinarian**, v.68, p.423-441, 1978.
- COMPTON, S.R; VIVAS-GONZALEZ, B.E; MACY, J.D. Reverse transcriptase polymerase chain reaction-based diagnosis and molecular characterization of new rat coronavirus strain. **Laboratory Animal Science**, v.49, n.5, p.506-513, 1999.
- COURA,F.M; FREITAS,M.D; RIBEIRO, J; LEME, R.A; DE SOUZA, C; ALFIERI, A.A; FILHO, A.J.F; DE CARVALHO, A.U. SILVA, M.X. Longitudinal study of Salmonella spp., Escherichia

coli, Rotavirus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. **Tropical Animal Health and Production**, v.47, n.1, p.3-11, 2015.

CHO, K. O; HASOKSUZ, M; NIELSEN, P.R; CHANG, K.O; LATHROP, S; SAIF, L.J Cross-protection studies between respiratory and calf diarrhea and winter dysentery coronavirus strains in calves and RT-PCR and nested PCR for their detection. **Archives of Virology**,v.146, p. 2401–2419, 2000.

DEA, S; MICHAUD, L; MILANE, G. Comparasion of bovine coronavirus isolates with neonatal caf diarrhea and winter dysentery in adult dairy cattle in Québec. **Journal General of Virology**, v.76, n. 5, p.1263-1270,1995.

FISCHER, F; PENG, D; HINGLEY, S.T; WEISS, R.R; MASTERS, P.S.The internal open reading frame whitin 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.

FOSTER, D.M; SMITH, G.W. Pathophysiology of diarrhea in calves. **Veterinary Clinical North America Food Animal Practice**, v.25, n.1, p.13-36, 2009.

GUILKSEN, S.M; JOR, E; LEKEN, T; AKERSTEDT, J; OSTERAS, T. Respiratory infections in Norwegian dairy calves. **Journal Dairy Science**, v. v.92, n.10, p.5139-5146, 2009.

GUNN, L; COLLINS, P.J; CONNELL, O; SHEA, O. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. **Irish Veterinary Journal**, v.68, n.31, p.2-7, 2015.

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

HASOKSUZ, M; HOET, A.E; LOERCH, S.C; WILTON, T.E; NIELSEN, P.R; SAIF, S.J. Detection of respiratory and enteric shedding of bovine coronaviruses in cattle in an Ohio feedlot. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.14, n.4, p.308-313,2002.

HASOKSUZ, M; ALEKSEEV, K; VLASOVA, A; ZHANG, X; SPIRO, D; HALPIN, R; WANG, S; GHEDIN, E; SAIF, L.J. Biologic, antigenic, and full-length genomic characterization of a bovine-like coronavirus isolated from a giraffe. **Journal of Virology**,v.81, n.10,p.4981-4990, 2007.

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

HOMBERGER,F.R. Enterotropic mouse hepatitis virus. **Laboratory animals**, v.31, n.2, p.97-115, 1997.

HORNER,G.W; HUNTER, R; KIRKBRIDE, C.A. A coronavirus-like agent present in faeces of cows with diarrhea. **New Zeland Veterinary Journal**, v.23, n.5, p.28, 1975.

IVANOV, A.K; HERTZIG,T; ROZANOV,M; BAYER,S; THIEL,V; GORBALENYA, A. E; ZIEBURH, J. Major genetic marker of nidoviruses encodes a replicative endoribonuclease. **PNAS**, v. 101, n.34, p.12694- 12699, 2004

ICTV – International Committee in Taxonomy of Viruses. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVbd>> Acesso em: 07 out.2015.

JEONG, J.H; KIM ,G.Y; YOON, S; PARK, S.J; KIM, Y.J; SUNG, C.M; JANG, O.J; SHIN, S.S; KOH, HB; LEE, C.Y; KANG, M.L; KIM, H.J; PARK, N.Y; CHO, K.O. Detection and isolation of Winter Dysentery Bovine Coronavírus circulated in Korea during 2002-2004. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.67, p. 187-189, 2005.

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

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

KANNO, T. Bovine Coronavirus Infection: Pathology and Interspecies Transmission. **Journal of Disaster Research**,v.7, n.3, p. 297-302, 2011.

KAPIL, S; RICHARDSON, K.L; MAAG, T.R; GOYAL, SM. Characterization of bovine coronavirus isolates/from eight different states in the USA. **Veterinary Microbiology**, v.67, p.221-233, 1999.

KENNEDY, S; OSWALD, N. **PCR troubleshooting and optimization: The essential guide**. Edinburg: Caister Academic Press,2011, p.226

KIN, N; MISZCZAK, F; DIANCOURT, L; CARO, V; MOUTOU, F; VABRET, A; GOUILH, M. Comparative molecular epidemiology of two closely related coronaviruses, bovine coronavirus (BCoV) and human coronavirus OC43 (HCoV-OC43), reveals a different evolutionary pattern.**Infection, genetics and evolution**, v.40, p.186-191,2016

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

LACERDA, R.C. **Impacto econômico da diarreia neonatal em explorações extensivas de bovinos de carne no concelho de Moura**. Lisboa: Universidade Lusófana de Humanidades e Tecnologia, 2014.60

LOJKIC, I; KRESIC, N; SIMIC, I; BEDEKOVIC, V. Detection and molecular characterisation of bovine corona and toroviruses from Croatian cattle. **Biomed Central Veterinary Research**, v. 11, p. 202.-210, 2015.

LORENZETTI, E; LEME, R.A; RIBEIRO, J; DE SOUZA, V.R.A; ALFIERI, A.F; ALFIERI, A.A. Neonatal diarrhea by bovine coronavirus (BCoV) in beef cattle herds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 3795-3800, 2013.

MAJHDI, F; MINOCHA, H.C; KAPIL, S. Isolation and characterization of a coronavirus from elk calves with diarrhea. **J Clin Microbiol**, v.35, n.11,p.2937-2942, 1997.

McNULTY, M.S; BRYSON, D.G; ALLAN, G.M; LOGAN, E.F. Coronavirus infection of the bovine respiratory tract. **Vet Microbiol**.v.9,p.425-434, 1984.

MARTINEZ, N; BRANDÃO, P.E; SOUZA, S.P; BARRERA, M; SANTANA, N; ARCE, H.D; PEREZ, L.J. Molecular and phylogenetic analysis of bovine coronavirus based on the spike glycoprotein gene. **Infection, genetics and evolution**,v.12, n.8, p.1870-1878, 2012

MEBUS,C.A; UNDERDAHL, N.R; TWIEHAUS, M.J. Isolation unit used in studies on neonatal calf diarrhea. **Am.J.Vet**, v.33, p.2335-2340, 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, n.2, p.145–150, 1973.

MUDGAL, G. Structural insights into coronavirus binding to host aminopeptidase N and interaction dynamics. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.2014.119p.

MULLIS, L; SAIF, L.J; ZHANG, X; AZEVEDO, M.D. Stability of bovine coronavirus on lettuce surfaces under household refrigeration conditions. **Food Microbiology**, v.30, n.2, p.180-186, 2012.

NARAYANAN,K; MAEDA, A; MAEDA, J; MAKINO, S. Characterization of the coronavirus m protein and nucleocapsid interaction in the infected cells. **Journal of virology**, v.74, n.17, p.8127- 8134, 2000.

NAVAS,S; SEO, S.H; CHA, M.M; SARMA, J.D; LAVI, E; HINGLEY, S.T; WEISS, S.R. Murine coronavirus spike protein determines the ability of the virus to replicate in liver and cause hepatitis. **Journal of virology**, v.75, n.5, p.2452-2457, 2001.

PARK, S.J; KIM, G.Y; CHOY, H.E; HONG, Y.J; SAILF, L.J; JEONG, J.H; KIM, H.H, KIM, S.K; SHIN, S.S; KANG, M.I; CHO, K.O. Dual enteric and respiratory tropisms of winter dysentery bovine coronavirus in calves. **Archives Virology**, v.152, n.10, p.1885-900,2006.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. Veterinary Medicine: **A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats**.10.ed. Philadelphia: Elsevier, 2007, p.2156

REYNOLDS,D.J; DEBNEY, T.G; HALL, G.A; THOMAS, L.H; PARSONS, K.R. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. **Archives Virology**, n.85,n1-2, p.71-83, 1986.

ROWE,L.C; BAKER,S.C; NATHAN,M.J; FLEMING,J.O. Evolution of mouse hepatitis virus: Detection and characterization of spike deletion variants during persistent infection. **Journal of Virology**, v.71 ,n.4 , p.2959-2969, apr, 1997.

SAIF, L.J. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the aetiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved ?. **Cornell Veterinarian**, v. 80, n. 4, p. 303-311, 1990.

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

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual.3ed: New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001

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

SCOTT,P.R; HALL, G.A.; JONES,P.W; MORGAN,J.H.Calf diarrhoea. In:ANDREWS, A.H ; BLOWEY, R.W.; BOYD, H; EDDY, R.G. **Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle** Oxford:BlackwellScienceLtd,p.185- 214,2004.

SCHULTZE, B; HERRLER, G. Bovine coronavirus uses N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid as a receptor determinant to initiate the infection of cultured cells. **Journal General of Virology**, v.73, n. 4, p.901-906, 1992.

SIDDELL,S; WEGE, H; MEULEN, E.T. The biology of coronaviruses. **Journal general of virology**, v.64, p.761-77, 1983.

SOUZA,S.P; ASANO, K.M; SILVA, S.O.S; RICHTZENHAIN, L.J; BRANDÃO, P.E. Analysis of spike and hemagglutinin-esterase genes of Brazilian strain of bovine coronavirus (BCoV) evidence multiple and previously not described lineages. **Virus Review and Research**, v.13, p.120, 2008.

SPAAN,W.J.M. Replication of coronaviruses. 89f. Thesis (Doctoral). Institute Diergeneeskunde aan de Rijksuniversiteit, Utrecht, 1984.

SPAAN,W; CAVANAGH,D; HORZINEK,M.C. Coronaviruses: structure and genome expression. **Journal of general virology**, v.69, n.12, p.2939-2952, 1988

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

STIPP,D.T; BARRY, A.F; ALFIERI, A.F; TAKIUCHI, E; AMUDE, A.M; ALFIERI, A.A. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. **Tropical Animal Health and Production**, v.41, n.7, p.1563-1567, 2009.

STORZ, J.; ROTT, R. Reactivity of antibodies in human serum with antigens of an enteropathogenic bovine coronavirus. **Medical microbiology and immunology**, v. 169, p. 169-178, 2000.

TAKIUCHI,E; BAREIROS, M.A.B; ALFIERI, A.F; ALFIERI, A.A. Identification of a mutation in the spike protein cleavage site in Brazilian strain of wild-type bovine coronavirus. **Brazilian journal of microbiology**, v.38,p .699-703,2007.

TAKIUCHI, E; STIPP, D.T; ALFIERI, A.F; ALFIERI, A.A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. **Journal of Virology Methods**,v.131, n.2, p.148-154, 2005.

TAKIUCHI, E; BARRY, A.F; ALFIERI,A.F; FILLIPSEN,P; ALFIERI,A.A. An outbreak of winter dysentery caused by bovine coronavirus in high-production dairy cattle herd from a tropical country. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.57-61, 2009.

TSUNEMITSU, H; YONOMECHI, H; HIRAI, T; KUDO, T; ONOE, S; MORI, K. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs from calves with diarrhea. **J.Vet. Med.Science**, v.53, n.3, p.433-437,1991

TSUNEMITSU, H.; SAIF, L. J. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. **Archives of Virology**, v. 140, p. 1303–1311, 1995.

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

VIJGEN,L; KEYAERTS,E; MOES,E; THOELLEN,I; WOLLANTS,E; LEMEY,P; VANDAMME,A.M; VANRANST,M. Complete genomic sequence of human coronavirus OC43: molecular clock analysis suggests a relatively recent zoonotic coronavirus transmission event. **J Virol**, v.79, n.3,p.1595-604,2005.

WENTWORTH,D.E; HOLMES,K.V. **Coronaviruses: Molecular and cellular biology**. 1 ed. Norfolk : Caister Academic Press, 2007, 350p.

YANG, D.K, KWEON, C.H; KIM, B.H; PARK, J.K; SO, B.J; SONG, J.Y. Serological Survey of Bovine Coronavirus in Korea. **Journal of Bacteriology and Virology** , V. 37, n. 2, p.105 – 109, 2007.

YE,R; MORRISON,C.M; MASTERS,P.S. Genetic analysis of determinants for Spike glycoprotein assembly into murine coronavirus virions: Distinct roles for charge-rich and cysteine-rich regions of the endodomain. **Journal of virology**, v.78, n.18, p.9904-9917, 2004

WOO, P.C.Y; SUSANNA, K. P; CAROL, S. F; LAM, A.C.C.Y; LAU, A K. L; TSANG,A; JONH, H. N; Jade, L. L; TENG,C. C. C; WANG, T.M; ZHENG, B.J. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. **J Virol**, v. 86, n.7,p. 3995–4008, 2012.

ZHANG, Z; ANDREWS, G.A; CHARD-BERGSTROM; 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.

ANEXO A – Resultado das reações de PCR para os genes N, S e HE de acordo com a idade, sexo, sistema de criação e exploração e ocorrência de diarreia.

ITEM	LVB	Idade	Sexo	Diarreia	Criação	Exploração	Gene N	Gene S1	Gene S	Gene HE
1	2763/08	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
2	2779/08	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
3	1339/09	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
4	124/09	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
5	123/09	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
6	024/10	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
7	631/10	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
8	23282/12	NI	F	P	Leite	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
9	23283/12	NI	F	P	Leite	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
10	23284/12	NI	F	P	Leite	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
11	23285/12	NI	F	P	Leite	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
12	23286/12	NI	F	P	Leite	Intensivo	POS	NEG	NEG	NEG
13	15265/12	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
14	18900/13	NI	NI	P	NI	NI	POS	POS	POS	NEG
15	18901/13	NI	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
16	15570/14	NI	F	P	Leite	Semi- intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
17	15571/14	NI	F	P	Leite	Semi- intensivo	POS	NEG	NEG	NEG
18	15572/14	1 m	M	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
19	15573/14	2 m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
20	15574/14	3 m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
21	15575/14	4 m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
22	15576/14	5 m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
23	16688/14	6 m	F	P	Corte	Extensivo	POS	NEG	NEG	NEG
24	1566/15	7 m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG

25	1567/15	1m	F	P	Leite	Semi- intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
26	1568/15	2 m	NI	P	Corte	Extensivo	POS	NEG	NEG	NEG
27	1569/15	2 m	NI	P	Corte	Extensivo	POS	NEG	NEG	NEG
28	1570/15	2 m	NI	P	Corte	Extensivo	POS	NEG	NEG	NEG
29	1571/15	2 m	NI	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
30	1572/15	2 m	NI	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
31	3677/15	2 m	NI	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
32	3678/15	2 m	NI	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
33	3679/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
34	3680/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
35	3681/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
36	3682/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
37	3683/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
38	3684/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	POS	NEG	POS	NEG
39	3685/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
40	3686/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
41	3687/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
42	3688/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	POS	NEG	NEG	NEG
43	3689/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
44	3690/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
45	3691/15	2 - 3m	NI	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
46	3692/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
47	3693/15	2 - 3m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
48	3694/15	6 - 7m	M	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
49	3695/15	6 - 7m	M	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
50	3696/15	6 - 7m	M	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
51	3697/15	6 - 7m	F	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
52	3698/15	6 - 7m	M	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
53	3699/15	6 - 7m	F	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
54	3700/15	6 - 7m	F	A	NI	NI	POS	NEG	POS	NEG

55	3701/15	6 - 7m	F	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
56	3702/15	6 - 7m	M	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
57	3703/15	6 - 7m	M	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
58	3704/15	6 - 7m	M	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
59	3705/15	6 - 7m	M	P	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
60	3706/15	6 - 7m	M	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
61	12737/15	6 - 7m	M	P	NI	NI	POS	NEG	NEG	NEG
62	12738/15	6 - 7m	F	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
63	15233/15	1m	NI	A	NI	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
64	15234/15	1m	M	P	Leite	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
65	15235/15	2-3m	M	P	Corte	Extensivo	POS	NEG	NEG	NEG
66	15350/15	2-3m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
67	15351/15	2-3m	M	P	Corte	Extensivo	POS	POS	NEG	NEG
68	15352/15	1m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
69	15353/15	1m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
70	18286/15	1m	M	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
71	18287/15	1m	F	P	Corte	Extensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
72	18288/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
73	18289/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
74	18290/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
75	18291/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
76	18292/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
77	18293/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
78	18294/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
79	18295/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
80	18296/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
81	18297/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
82	18298/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
83	18299/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
84	18300/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG

85	18301/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
86	18302/15	NI	M	P	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
87	18303/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
88	18304/15	NI	F	A	Leite	NI	POS	NEG	POS	NEG
89	18305/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
90	18306/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
91	18307/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
92	18308/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
93	18309/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
94	18310/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
95	21181/15	NI	F	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
96	21182/15	NI	M	A	Leite	NI	NEG	NEG	NEG	NEG
97	21183/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
98	21184/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
99	21185/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	POS	NEG	NEG	NEG
100	21186/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
101	21187/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
102	21188/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	POS	NEG	NEG	NEG
103	21189/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
104	21190/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
105	21191/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
106	21192/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
107	21193/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
108	21194/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
109	21195/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	POS	NEG	NEG	NEG
110	21196/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
111	21197/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
112	21198/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
113	21199/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG
114	21200/15	15m	M	A	Corte	Intensivo	NEG	NEG	NEG	NEG

ANEXO B – Certificado do comitê de ética

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO BIOLÓGICO

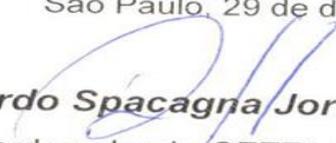
COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CETEA-IB

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 146/15** sobre o Projeto: “**Análise filogenética de amostras brasileiras de vírus da febre aftosa (FMD) em suínos**”, sob a responsabilidade de **Edviges Maristela Pituco**, está de acordo com os princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBE), Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA).

Protocolo aprovado pela *CETEA-IB* em 29 de dezembro de 2015.

São Paulo, 29 de dezembro de 2015.


Ricardo Spacagna Jordão
Coordenador da *CETEA-IB*



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



