



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

DANILO TANCLER STIPP

**DETECÇÃO DO CORONAVÍRUS BOVINO EM EPISÓDIOS
DE DIARRÉIA NEONATAL EM REBANHOS BOVINOS
BRASILEIROS**

Londrina
2007

DANILO TANCLER STIPP

**DETECÇÃO DO CORONAVÍRUS BOVINO EM EPISÓDIOS
DE DIARRÉIA NEONATAL EM REBANHOS BOVINOS
BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (área de concentração: Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina, para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2007

DANILO TANCLER STIPP

**DETECÇÃO DO CORONAVÍRUS BOVINO EM EPISÓDIOS
DE DIARRÉIA NEONATAL EM REBANHOS BOVINOS
BRASILEIROS**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Paulo Gagliardi Leite
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. João Luis Garcia
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 22 de março de 2007.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

DEDICATÓRIA

Às pessoas essenciais para minha vida:
Meus pais Paulo e Ana Maria Stipp, à(s) minha(s) irmã(s) Aline (e Julie),
e à minha noiva Rejane;
fontes de amor, carinho e apoio em todos os momentos.

A todos os meus familiares,
em especial ao meu avô Geraldo Tancler (*in memoriam*),
que nunca deixou me faltar garra e amor no que faço.

À minha tia Mara Regina Stipp Balarin,
fundamental na escolha de meu caminho profissional
e exemplo de profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me iluminado ao longo deste trabalho, tornando possível a concretização desse sonho.

Aos meus queridos pais Paulo e Ana Maria, e à minha amada irmã Aline; pela compreensão, paciência, carinho e apoio em todos os momentos, sempre me auxiliando no que fosse necessário. Amo vocês.

À minha amada noiva Rejane, pela compreensão, carinho e, principalmente, pelo amor e companheirismo ao longo desta jornada; lembranças que jamais se apagarão da minha memória e do meu coração. Sempre te amarei.

Aos meus tios Antônio Carlos M. Stipp, Mara Regina Stipp Balarin e Oscar Francisco Balarin, pelos conselhos, pela ajuda e por me mostrarem o caminho a ser seguido nesta carreira tão digna e gratificante.

A todos os meus familiares, em especial meus padrinhos Francisco e Carmem Tancler, e Rogério Tancler; e às minhas avós Nilza Tancler e Ada Stipp (*in memoriam*), que sempre estará no meu coração; agradeço a todos pelo respeito e confiança.

Ao professor e orientador Prof. Dr. Amauri A. Alfieri pela oportunidade concedida e confiança em mim depositada. Agradeço-o por todos os conselhos que recebi, pelo excelente convívio ao longo dos anos e pelo exemplo de profissionalismo a ser seguido. Agradeço-o ainda pela paciência no decorrer da realização deste “parto distócico”. Meu muito obrigado!

À professora Dra. Alice Fernandes Alfieri pela confiança e amizade desde os tempos de graduação.

Aos membros da Comissão Examinadora na banca de qualificação: Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley, Prof. Dr. João Luis Garcia e Profa. Dra. Alice Fernandes Alfieri pelas valiosas contribuições.

À Elisabete Takiuchi pela ajuda indispensável, consideração, confiança e, principalmente, pela amizade durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho; onde os momentos de alegria e descontração também não serão esquecidos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Mestrado.

A todos os professores do curso de graduação em Medicina Veterinária e do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, em especial aos professores: Italmar Teodorico Navarro, Julio Cesar de Freitas, Ernst Ekehardt Müller, Odilon Vidotto, Milton Hissashi Yamamura, Nilva Maria Freres Mascarenhas, Pedro Luiz de Camargo, Julio Augusto Naylor Lisboa, Laurenil Gaste, Wilmar Sachetin Marçal,

Peter Reichmann e Ney Carlos Reichert Netto; muito obrigado pela amizade, conhecimento e formação acadêmica científica.

Aos funcionários da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPPG) pelo auxílio e atenção durante a realização dos trabalhos.

À minha grande amiga Kerlei Cristina Médici, minha primeira orientadora; por todos os momentos de ensinamento, cobranças e puxões de orelha, risadas e “churrascos do ralo” nestes anos de inesquecível convívio.

Às grandes amigas e profissionais Dalíria do Prado e Maria Yoshie, exemplos de integridade, meu muito obrigado pelos ensinamentos e momentos de alegria que jamais serão esquecidos.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva em especial ao José Aldivino, Ademir, José Roberto, Joãozinho e Dona Cida, por cada conversa, risadas e cumprimentos pelos corredores.

Aos secretários Reinaldo, Nelson e Helenice pela paciência e atenção.

Às grandes amizades que fiz ao longo deste período de trabalho, pessoas às quais serei eternamente grato. Aos grandes amigos Márcio de Nadai Bonin, Marcos Coelho de Carvalho e Daniel Vivian (Frango), pelos conselhos que recebi, confiança, respeito e companheirismo; além dos momentos de descontração e muita risada. Aos amigos do “lab” Marlise, Michele Lunardi, Gustavo Romero, Gleí, Guilherme Braga, Alexandre Amude, Juliana Dias, Daniela Pilz, Flora Kano, Fábio Negrão, Aline Barry e Rita Linares, meu muito obrigado por toda ajuda e consideração, jamais me esquecerei de vocês. Aos demais amigos Alexandre e Fabrício Monteiro, Bruno Mazzer, Flávio Shigueru, Bruna Lima, Luciana Takemura, Gisele Romão, Cláudia Boseli, Luciano Malanski, Daniela Bergamin, Melissa, Bruno Botaro, Danilo “Peba” Ferreira, Ivan e Thiago Stella, Nelson, Richard, Vicente Fregonesi, Kledir, Kátia e Michele; pessoas que certamente ficarão guardadas no lado esquerdo do peito, meu muito obrigado pelo companheirismo e respeito em todos estes anos de convivência. À consultora Viviane Rodrigues e ao amigo Paulo Negri pelos conselhos e ensinamentos desta arte chamada comunicação e expressão verbal, indispensáveis em minha jornada.

A todos os estagiários e bolsistas de iniciação científica do laboratório de Virologia Animal da UEL.

À Universidade Estadual de Londrina pela estrutura e suporte fornecidos.

Por fim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que deixei de citar, muito obrigado.

STIPP, D. T. **Detecção do coronavírus bovino em episódios de diarreia neonatal em rebanhos bovinos brasileiros.** 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal, área de concentração em Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

RESUMO

A diarreia neonatal é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em bezerros, determinando grandes prejuízos econômicos à pecuária leiteira e de corte em todo o mundo. As causas que determinam a diarreia neonatal bovina são complexas e multifatoriais. O coronavírus bovino (BCoV) é um importante agente etiológico das diarreias virais de bezerros. No entanto, a detecção do vírus a partir de amostras de fezes diarreicas é raramente investigada nos rebanhos bovinos brasileiros. Dados epidemiológicos quanto a frequência da infecção do BCoV em rebanhos da América do Sul também são escassos. Além disso, a exigência de técnicas de diagnóstico sensíveis e específicas, como a RT-PCR, são fundamentais para o estabelecimento da real prevalência do BCoV em rebanhos bovinos. O objetivo deste estudo foi avaliar aspectos epidemiológicos da infecção pelo BCoV em rebanhos bovinos brasileiros. A frequência de detecção do BCoV foi avaliada a partir de amostras fecais diarreicas ($n = 221$) e não-diarreicas ($n = 61$) de bezerros com até 60 dias de idade provenientes de rebanhos leiteiros e de corte de quatro estados brasileiros (São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso), correspondendo a três regiões geográficas (Sul, Sudeste e Centro-Oeste). A técnica de semi-nested PCR (SN-PCR) foi utilizada para a detecção da região altamente conservada do gene que codifica a nucleoproteína do BCoV. A taxa de detecção do BCoV nas amostras de fezes diarreicas (19,8%) foi significativamente superior ($p=0,0027$) que em fezes de consistência normal (3,2%). A infecção foi detectada em bezerros de todas as faixas etárias com maior prevalência ($p= 0,0012$) em animais com 16 a 30 dias de idade. Duas estirpes selvagens do BCoV, detectadas à partir de amostras de fezes diarreicas, foram isoladas em cultura de células de adenocarcinoma retal humano (HRT-18). As estirpes virais isoladas foram identificadas como BCoV por meio da visualização de efeito citopático característico do BCoV na cultura celular, pela SN-PCR, RFLP com a enzima *Hae III*, e seqüenciamento dos fragmentos amplificados na SN-PCR. A detecção do BCoV em infecções de bezerros provenientes de rebanhos de leite e corte em todas as regiões geográficas pesquisadas e o número de amostras diarreicas positivas para o BCoV demonstram que esta infecção entérica é uma importante causa da diarreia neonatal nos rebanhos bovinos brasileiros.

Palavras-chave: Diarreia neonatal bovina. Coronavírus bovino. SN-PCR. Isolamento viral.

ABSTRACT

STIPP, D. T. **Detection of bovine coronavirus in neonatal diarrhea episodes from Brazilian cattle herds.** 2007. 82p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

ABSTRACT

The neonatal diarrhea is one of the main causes of calf morbidity and mortality, and determines great economical losses to dairy and beef cattle herds worldwide. The causes of neonatal calf diarrhea are complex and multifactorial. The bovine coronavirus (BCoV) is an important etiological agent of viral diarrhea in calves, however, the detection of this virus in diarrheic fecal samples is rarely accomplished in Brazilian cattle herds. Epidemiological data on the frequency of BCoV infection in South America livestock farms is very limited. Moreover, the applicability of a sensitive and specific diagnostic technique such as RT-PCR is fundamental to not underestimating the real prevalence of BCoV. The aim of this study was to obtain some epidemiological data of the BCoV infections in Brazilian cattle herds. We evaluated the BCoV frequency in 282 fecal samples (221 diarrheic; 61 normal-control) from calves up to 60-days-old from beef and dairy cattle from four Brazilian States (São Paulo, Paraná, Minas Gerais, and Mato Grosso) corresponding three (South, Southeast, Center-west) geographical regions. A semi nested-PCR assay was used for detection of a highly conserved region of the BCoV nucleoprotein gene. The rate of BCoV detection in diarrheic fecal samples (19.8%) was significantly higher ($p=0.0027$) than in feces with normal consistency (3.2%). The infection was detected in all age groups evaluated with greater prevalence ($p= 0.0012$) in calves with 16 to 30-days-old. Two wild-type BCoV strains from calves with diarrhea were isolated in monolayers of human rectal tumor (HRT-18) cells. The isolated virus strains were identified as BCoV by characteristic cytopathic effect in cell culture, SN-PCR assay, RFLP with Hae III enzyme, and sequencing of the PCR-amplicons. The detection of the BCoV infection in beef and dairy calves from all geographical regions assessed, and the rate of BCoV positive diarrheic fecal samples showed that this enteric infection is an important cause of neonatal calf diarrhea in Brazilian cattle herds.

Keywords: Neonatal calf diarrhea. Bovine coronavirus. SN-PCR. Virus isolation.

Diarréia neonatal e o coronavírus bovino

Fig.1. – Modelo estrutural do coronavírus. **A:** diagrama esquemático da estrutura do virion. S, glicoproteína da espícula; M, proteína da membrana; E, proteína do envelope; HE, glicoproteína HE; N, proteína do nucleocapsídeo. **B:** Estrutura genômica dos diferentes grupos de coronavírus: organização dos genes codificadores de proteínas estruturais e não-estruturais.....17

Frequency of bovine coronavirus detected by semi-nested PCR in fecal samples of calves from Brazilian cattle herds.

Fig.1. – Semi-nested PCR of bovine Coronavirus N gene in fecal specimens from calves in Brazilian cattle herds. Lane 1: ladder, 123 bp (Invitrogen™ Life Technology, USA); lanes 3 and 4: liquid fecal samples; lanes 5 and 6: pasty fecal samples; lanes 7 and 8: normal control fecal samples; lanes 2 and 9: negative controls.....55

Isolation of Brazilian wild-type bovine coronavirus strain in HRT-18 cells from diarrheic feces of naturally infected calves

Fig.1. – Restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *Hae* III enzyme of BCoV N gene amplicons. Lane 1: 123 bp ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); lanes 2, 4, 6 and 10: BCoV N gene SN-PCR amplicons; lanes 3, 5, 7 and 11: RFLP of BCoV N gene SN-PCR amplicons. Lanes 2–7: HRT-18 cell isolates; lanes 10 and 11: BCoV Mebus strain68

LISTA DE TABELAS

Frequency of bovine coronavirus detected by semi-nested PCR in fecal samples of calves from Brazilian cattle herds.

Table 1 – Detection of BCoV by SN-PCR assay in diarrheic fecal specimens from calves in Brazilian cattle herds51

Table 2 – Relationship between fecal consistency and rate of bovine coronavirus detection by SN-PCR assay in fecal samples from calves up to 60 days-old.....52

Table 3 – Distribution of SN-PCR results for bovine coronavirus detection in fecal samples from calves by age groups52

Isolation of Brazilian wild-type bovine coronavirus strain in HRT-18 cells from diarrheic feces of naturally infected calves

Table 1 – Sequence identity matrix between the isolates and Mebus BCoV strain67

LISTA DE QUADROS

Diarréia neonatal e o coronavírus bovino

Quadro 1 – Freqüência de diagnóstico etiológico do coronavírus bovino em fezes de bezerros.....	21
--	----

1 REVISÃO DE LITERATURA	14
Introdução	15
Coronavírus bovino	16
Epidemiologia.....	19
Patogenia e sinais clínicos	22
Imunologia.....	25
Diagnóstico.....	26
Tratamento	28
Controle e profilaxia	30
Vacinação.....	32
Considerações finais	32
2 OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	43
3.1 Frequency of bovine coronavirus detected by semi-nested PCR in fecal samples of calves from Brazilian cattle herds	44
Abstract.....	45
Resumo.....	46
Introduction.....	47
Materials and Methods	48
Results	51
Discussion	52
References	57
3.2 Isolation of Brazilian wild-type bovine coronavirus strain in HRT-18 cells from diarrheic feces of naturally infected calves	60
Abstract.....	61
Resumo.....	62
References	69

4 CONCLUSÕES	72
APÊNDICES	74
Apêndice A – Lista de reagentes.....	75
Apêndice B – Soluções e tampões.....	77
Apêndice C – Protocolo de técnicas.....	80

1 REVISÃO DE LITERATURA

1 DIARRÉIA NEONATAL E O CORONAVÍRUS BOVINO

INTRODUÇÃO

A diarréia neonatal bovina é uma das principais causas de morbidade e mortalidade de bezerros em todo o mundo, determinam grandes prejuízos econômicos à atividade pecuária em vários países. Os trabalhos que quantificam os prejuízos econômicos determinados pela diarréia neonatal bovina são esporádicos. No final da década de 1970, House (1968) estimou que nos EUA as diarréias neonatais em bovinos ocasionavam prejuízos econômicos anuais superiores a US\$ 100 milhões e que 20 a 30% desse valor era atribuído às diarréias ocasionadas pelo coronavírus bovino (BCoV). Os prejuízos incluem os custos adicionais com: i) a medicação e mão-de-obra envolvidas com o tratamento dos bezerros; ii) o diagnóstico e imunoprofilaxia; iii) a maior susceptibilidade dos animais a outras infecções, particularmente as respiratórias; iv) a redução da produtividade daqueles animais onde a infecção foi mais intensa; v) morte dos animais gravemente acometidos (PAUL e LYOO, 1993).

A etiologia das diarréias neonatais em bezerros é complexa e envolve múltiplos fatores. Os fatores ambientais e nutricionais estão entre as causas mais freqüentes de diarréia de origem não-infecciosa. As diarréias de etiologia infecciosa dos bezerros podem ser ocasionadas por uma variedade de enteropatógenos incluindo bactérias (*E. coli* enterotoxigênica; *Salmonella* sp; *Clostridium perfringes* tipo C), protozoários (*Cryptosporidium* sp e *Eimeria* sp), fungos (*Cândida glabatra*) e vírus (rotavírus, coronavírus, torovírus e calicivírus). Esses microrganismos podem atuar de forma isolada ou em associação, comprometendo ainda mais a gravidade do quadro clínico (SNODGRASS *et al.*, 1986; JANKE, 1989, ELAD *et al.*, 1998).

Entre os processos diarréicos de etiologia viral os rotavírus e os coronavírus estão entre os patógenos mais freqüentemente diagnosticados em bezerros com até 60 dias de idade (JANKE, 1989; CLARK, 1993). O rotavírus bovino (BRV) é uma das principais etiologias virais de focos de diarréia em bezerros em

todo o mundo, sendo que a maior frequência de diagnóstico ocorre em animais com até 30 dias de idade (VENDE *et al.*, 1999). A identificação do BCoV como causador de diarreia em bezerros neonatos é descrita em vários países. Embora a diarreia seja reconhecida como a principal evidência clínica da infecção por este vírus, o trato respiratório dos bezerros também pode ser comprometido. O BCoV também está relacionado ao quadro clínico conhecido como “Disenteria do Inverno” em bovinos adultos (CLARK, 1993).

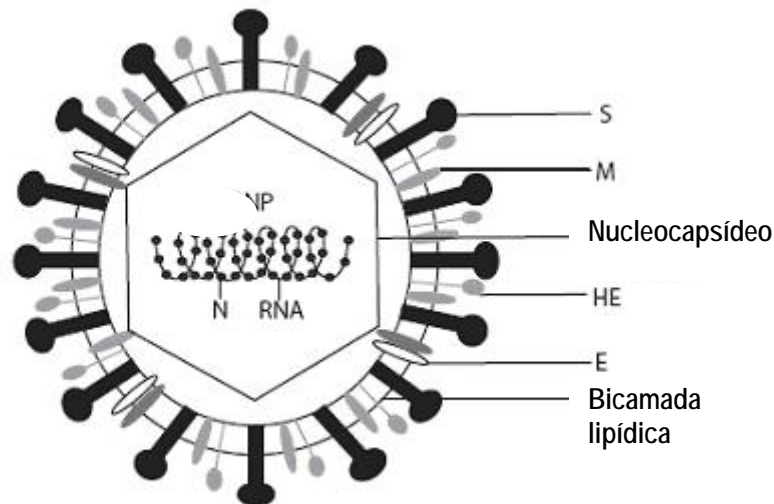
CORONAVÍRUS BOVINO

A primeira doença associada a um coronavírus foi a Bronquite Infecciosa das Galinhas, causada pelo vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV). Em 1931, foi relatada uma doença respiratória aguda e fatal em galinhas jovens nos EUA, com o isolamento do vírus a partir de exsudatos inoculados em ovos embrionados. A história dos coronavírus teve um período de silêncio até que, em 1946 foi relatada uma doença em suínos que determinava alta mortalidade em leitões. A infecção, denominada gastroenterite transmissível dos suínos (TGE) foi reproduzida experimentalmente em leitões neonatos pela administração de filtrados de órgãos de suínos acometidos pela infecção (LAI e HOLMES, 2001).

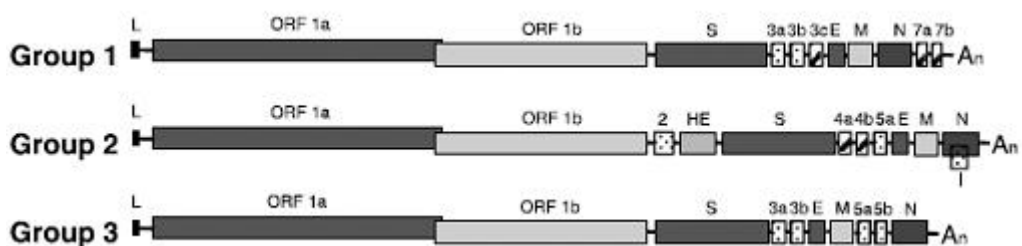
A estrutura do coronavírus foi primeiramente determinada por microscopia eletrônica em 1964, onde observou-se espículas no envelope do vírus que se assemelhavam a uma coroa (do latim *corona*). Em 1967, determinou-se que os coronavírus dos animais domésticos possuíam a mesma estrutura e, somente na década de 1990, observou-se essa mesma correlação quanto a organização genômica e estratégia de replicação (CAVANAGH, 1997; LAI e HOLMES, 2001).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), os coronavírus são classificados na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, a qual compreende os gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*. Fazem parte ainda desta ordem as famílias *Arteriviridae* e *Roniviridae* (ICTV data-base). O gênero *Coronavirus* é ainda subdividido em três grupos (I, II e III) definidos por epítomos presentes nas glicoproteínas do envelope, pela seqüência de nucleotídeos e por seus hospedeiros naturais (GONZALEZ *et al.*, 2003).

O BCoV pertence ao grupo II e apresenta na microscopia eletrônica um diâmetro variável de 100 a 150 nm, envolto por envelope glicoprotéico constituído por espículas que são projetadas em sua superfície. O genoma viral é constituído por RNA fita simples de polaridade positiva, cujo tamanho pode variar de 27 a 32 kb, que o torna o mais longo de todos os vírus conhecidos que possuem RNA genômico (LAI e CAVANAGH, 1997). O genoma codifica cinco proteínas estruturais principais: a proteína do nucleocapsídeo (N); a proteína transmembrana ou de matriz (M); a proteína da espícula (S); a hemaglutinina-esterase (HE); e a proteína externa de membrana (E) (SPAAN *et al.*, 1988). As projeções peploméricas presentes no envelope conferem ao vírus características específicas quanto a sua morfologia, e são formadas pelas glicoproteínas S e HE (Fig.1).



A



B

Fonte: Lai e Holmes, 2001; Gonzáles *et al.* (2003)

Fig.1. Modelo estrutural do coronavírus. **A:** diagrama esquemático da estrutura do virion. S, glicoproteína da espícula; M, proteína da membrana; E, proteína do envelope; HE, glicoproteína HE; N, proteína do nucleocapsídeo. **B:** Estrutura genômica dos diferentes grupos de coronavírus: organização dos genes codificadores de proteínas estruturais e não-estruturais.

A glicoproteína S, em forma de “pétala” é dividida em três porções: i) externa, que ainda é subdividida nas subunidades S1 e S2; ii) transmembrana e iii) porção citoplasmática. A subunidade S1 é a porção globular da glicoproteína e forma a metade da espícula. Contém seqüências protéicas responsáveis pela ligação viral a receptores específicos presentes na membrana das células alvo. A seqüência de aminoácidos (aa) é variável, podendo haver substituições ou deleções durante a replicação, que diferenciam as estirpes virais. Mutações nas seqüências da S1 têm sido associadas com alterações na antigenicidade e patogenicidade do BCoV (FAZAKERLEY *et al*, 1992; HINGLEY *et al.*, 1994). Em contraste, a subunidade S2, que forma a haste da espícula, é a mais conservada entre as espécies de coronavírus. É responsável pela fusão de membranas e formação de sincícios, em função de não apresentar domínios hidrofóbicos expostos. Esta subunidade não está envolvida na ligação ao receptor celular (de GROOT *et al*, 1987).

Como característica exclusiva de grupo, os coronavírus do grupo II apresentam a glicoproteína HE sob a forma de dímeros, formando espículas no envelope viral (SCHULTZE *et al*, 1991). Assim como a proteína S, a HE contribui para a atividade hemaglutinante do vírus; apresenta atividade enzimática (RDE – *receptor-destroying enzyme*) que inativa os receptores celulares dos eritrócitos (VLASAK *et al.*, 1988). A HE pode ainda mediar a adsorção inicial do vírus à membrana celular e as etapas subseqüentes da entrada do vírus nas células hospedeiras, porém essa entrada somente é possível por meio da interação da glicoproteína S com receptores específicos (DEREGT *et al*, 1989).

A proteína M recebe a denominação de proteína transmembrana por estar localizada entre o envelope e o capsídeo viral, integrando-os, onde apenas uma pequena parte é exposta no envelope (ARMSTRONG *et al.*, 1984). A proteína M desempenha função na montagem da partícula viral, formando a estrutura do envelope e o *core*. Essa proteína é bastante conservada e a ocorrência de mutações não ocasiona alterações de patogenicidade e no tropismo por tecidos, ao contrário do que ocorre com a proteína S e, particularmente, a subunidade S1 (HAZOKSUZ *et al.*, 2002). Devido a uma pequena projeção de parte da glicoproteína no envelope viral, em presença de complemento, anticorpos para esse determinante antigênico podem inibir a infecção (COLLINS *et al*, 1982).

A proteína N é uma fosfoproteína que associada ao RNA genômico forma o nucleocapsídeo helicoidal e está envolvida na regulação da síntese do RNA

viral (CLARK, 1993). Apresenta três porções estruturais relativamente bem conservadas: i) a de ligação com o RNA, ii) uma porção que a une à proteína M, iii) outra porção de ligação com membranas celulares e fosfolipídios, propriedade que facilita a montagem e formação de complexos para a replicação do RNA viral (ANDERSON e WONG, 1993).

A proteína E é parte integral de membrana que, juntamente com a proteína M, participa da montagem da estrutura viral. Para algumas espécies de coronavírus, as células que expressam somente as proteínas M e E têm demonstrado auto-suficiência para a formação de estruturas semelhantes às partículas virais (de HAAN *et al.*, 1998). A capacidade de induzir apoptose em células infectadas também tem sido atribuída à proteína E (AN *et al.*, 1999).

EPIDEMIOLOGIA

O diagnóstico etiológico do coronavírus em episódios de diarreia neonatal em bovinos é difícil de ser realizado, diferentemente do BRV. Fatores como: i) o menor número de partículas virais eliminadas na fase aguda da infecção; ii) a menor resistência dos virions às condições desfavoráveis do meio ambiente e de conservação; iii) a presença de envelope lipoprotéico; iv) e por apresentar um genoma de fita simples, sendo passível de uma degradação mais rápida; determinam um possível comprometimento do diagnóstico etiológico empregado, tanto em sua sensibilidade quanto em sua especificidade. Essas características podem interferir tanto nas técnicas desenvolvidas para a identificação da partícula viral (isolamento em cultivo celular e microscopia eletrônica) quanto àquelas para a identificação de seus componentes como proteínas (HA/HI, imunofluorescência e imunoperoxidase) e ácido nucléico (RT-PCR).

Com isso, os estudos envolvendo a identificação do coronavírus em fezes diarréicas de bezerros são pouco disponíveis comparados com outros enteropatógenos, incluindo o rotavírus. Trabalhos realizados em alguns países descrevem taxas de diagnóstico positivo que variam de 8 a 41% da amostragem analisada. Os resultados variam substancialmente de acordo com a abordagem

utilizada para a definição da amostragem e, principalmente, da técnica de diagnóstico empregada (Quadro 1).

No Brasil ainda são poucos os grupos que se dedicam ao diagnóstico do BCoV. Jerez *et al.* (2002), utilizando as técnicas de HA e HI identificaram o BCoV em 28 (39%) amostras de fezes diarréicas provenientes de rebanhos bovinos com aptidão leiteira do Estado de São Paulo. Jerez *et al.* (2005) descreveram ainda o isolamento em cultivo celular do BCoV a partir de extratos fecais previamente identificados como positivos por HA/HI. Mais recentemente, Takiuchi *et al.* (2006), utilizando a técnica de semi-nested PCR, identificaram o RNA do BCoV em 12 (24%) amostras de fezes diarréicas colhidas de bezerros com até 30 dias de idade. A amostragem ($n=50$) incluiu espécimes clínicas provenientes dos estados do Paraná,

Quadro.1 – Frequência de detecção do coronavírus bovino em fezes de bezerros.

Local	Aptidão	Técnica	Rebanhos		Amostras		Referência bibliográfica
			Total	Positivos (%)	Total	Positivas (%)	
Reino Unido	Corte / Leite	ME	32	13 (41,0)	302	11 (8,0)	Snodgrass <i>et al.</i> , 1986
Iran	Corte / Leite	RT-PCR	-	-	188	17 (9,0)	Khalili <i>et al.</i> , 2006
EUA	Utah	Corte / Leite	01	01 (100,0)	34	14 (41,0)	Peterson <i>et al.</i> , 1976
	Dakota do Sul	Corte / Leite	-	-	689	92 (13,4)	Langpap <i>et al.</i> , 1979
	Ohio	Leite	02	01 (50,0)	08	02 (25,0)	Heckert <i>et al.</i> , 1990
Brasil	SP	Leite	16	08 (50,0)	72	28 (39,0)	Jerez <i>et al.</i> , 2002
	SP, PR e MS	Corte / Leite	-	-	50	12 (24,0)	Takiuchi <i>et al.</i> , 2006

ME (Microscopia eletrônica); HA / HI (Hemaglutinação / Inibição da hemaglutinação); RT-PCR (Transcrição reversa seguida da reação da polimerase em cadeia); SN-PCR (semi-nested PCR).

São Paulo e Mato Grosso do Sul e foram identificadas amostras positivas em animais provenientes dos três estados da Federação.

Apesar de não constituir-se em uma ferramenta de diagnóstico etiológico definitivo, a sorologia pode ser utilizada em inquéritos soropidemiológicos, com o objetivo de determinar a frequência de animais sororeagentes em uma determinada população, ou mesmo em uma categoria animal estratificada por faixa etária. Em animais jovens os resultados, que podem sofrer interferência da presença de anticorpos passivos, devem ser interpretados com muita cautela. Independentemente da técnica sorológica utilizada, com frequência as taxas de animais soropositivos são altas (89% a 93%), indicando que a infecção é endêmica na maioria dos rebanhos bovinos (MOTHA e HANSEN, 1998; TRAVEN *et al.*, 1999).

PATOGENIA E SINAIS CLÍNICOS

A patogenia da coronavirose bovina tem sido demonstrada por meio da transmissão fecal-oral, com subsequente enterite. Também é proposto que a transmissão por aerossóis e a replicação do vírus no trato respiratório dos animais seja importante fator na patogênese da infecção (SAIF e SMITH, 1985).

O BCoV infecta enterócitos maduros, localizados na superfície das vilosidades intestinais, e células epiteliais do trato respiratório superior. Estudos comparativos indicam que estirpes do BCoV isoladas tanto do trato intestinal quanto do trato respiratório de bezerros replicam-se em enterócitos e em células do trato respiratório superior. Estudos com inoculação experimental sugerem que o vírus apresenta período de incubação relativamente curto, cerca de 20 a 30 horas (LEWIS e PHILIPS, 1978).

A adsorção do vírus à célula hospedeira é uma das etapas mais críticas de qualquer infecção viral. O BCoV utiliza o ácido siálico, um grupo de monossacarídeos presente na membrana citoplasmática celular, como seu receptor específico, o que determina o tropismo. A adesão inicial do virion à célula se dá pela ligação da glicoproteína HE, composta pela enzima sialato-9-0-acetilesterase, ao receptor celular. A glicoproteína S também determina a adsorção viral e, além disso,

é responsável pela fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática celular, etapa crucial para a infecção viral (POPOVA e ZHANG, 2002).

A adesão e a entrada das partículas virais na célula ocorrem pela região apical e, em menor número, pela região basolateral quando junções entre as células se encontram separadas, tornando possível essa rota de infecção pelo vírus. As partículas virais são formadas no citoplasma da célula hospedeira e adquirem o envelope pelo brotamento a partir do retículo endoplasmático rugoso. As partículas são posteriormente transportadas e acumuladas no Complexo de Golgi (LIN *et al.*, 1997).

Doughri *et al.* (1976) detectaram, por microscopia eletrônica, que a liberação da progênie viral a partir de células infectadas na mucosa do jejuno e do íleo ocorre pela lise e fragmentação da porção apical da membrana citoplasmática celular. Este mecanismo libera o conteúdo citoplasmático, juntamente com os virions, no lúmen intestinal. O conteúdo citoplasmático celular liberado leva à digestão e lise de outras células infectadas que contêm os vírus unidos a vacúolos citoplasmáticos repletos de enzimas proteolíticas, o que resulta em uma reação em cadeia de lise celular.

Estudos demonstraram que o local de liberação das partículas virais está intimamente relacionado com o acúmulo das glicoproteínas do envelope de alguns vírus, como o vírus influenza tipo C e o vírus da leucemia murina, que são diretamente transportadas à superfície celular (STEPHENS e COMPANS, 1986). Por ser também um vírus envelopado, contendo proteínas estruturais igualmente expostas na membrana citoplasmática da célula infectada, este mecanismo de liberação pode também ser utilizado pelo BCoV. Lin *et al.* (1997) demonstraram por microscopia eletrônica esse mecanismo *in vitro*, em cultivo de células de linhagem HRT-18, e observaram a liberação da progênie viral na região apical das células, local onde são expressas as proteínas estruturais durante o ciclo de replicação viral.

Langpap *et al.* (1979), por histopatologia, observaram extensas lesões intestinais, principalmente nas células da cripta do jejuno, com degeneração aguda e destacamento das células das vilosidades, e lesões necróticas na mucosa do cólon. Nos bezerros que sobreviveram ao quadro de diarreia persistente as vilosidades intestinais apresentaram redução no tamanho, presença de células imaturas, e algumas células da cripta estavam dilatadas, cobertas com muco e debris celulares. Em estágios crônicos da doença as células da cripta apresentaram-

se hiperplásicas, dispostas desordenadamente e com acúmulo de células inflamatórias mononucleadas entre as células degeneradas da cripta.

A extensão das lesões é semelhante à produzida pelo BRV. A recomposição celular é rápida, uma vez que as células da cripta, freqüentemente, não são afetadas. A liberação dos virions e a lise das células infectadas determinam atrofia das vilosidades. Estas mudanças afetam a função intestinal. A perda de enterócitos maduros e a substituição por células imaturas, que não produzem lactase, determinam redução na absorção da glicose e da galactose, provenientes da digestão da lactose pela mucosa intestinal. Com isso, há acúmulo de lactose e hiperosmolaridade, que impedem a absorção de água e eletrólitos do bolo alimentar contribuindo, dessa forma, com o processo de desidratação (SCOTT *et al.*, 2004).

A gravidade do quadro clínico decorrente da infecção pelo BCoV está relacionada com a faixa etária e com as condições imunológicas dos animais; com a dose infectante e a estirpe viral envolvida; com fatores ambientais; com os diferentes tipos de manejo zootécnico-sanitário e com o envolvimento de outros enteropatógenos (PAUL e LYOO, 1993). Os bezerros mais jovens e desprovidos de colostro apresentam diarreia mais grave e de curso agudo, que é clinicamente indistinguível da diarreia determinada pelo rotavírus (CLARK, 1993).

Woode e Bridger (1975) observaram que em infecção experimental os animais apresentaram diarreia entre 18 e 24 horas pós-inoculação. Geralmente, a diarreia causada pelo BCoV é mais liquefeita e mais grave quando comparada à ocasionada pelo rotavírus, conduzindo a rápida desidratação e acidose. Redução do apetite ou do reflexo de sucção, depressão e fraqueza progressivas constituem sinais típicos, embora inespecíficos, da infecção por este agente. Os quadros crônicos determinam perdas consideráveis de sódio, potássio, cloretos e íons bicarbonato (LEWIS e PHILIPS, 1978).

Hipertermia também pode ocorrer, porém em menor intensidade. Em um estudo experimental, bezerros com idade entre 4 a 9 semanas se infectaram por contato direto com um animal experimentalmente infectado. Os animais apresentaram hipertermia moderada (40,2 – 40,5°C) 3 a 5 dias pós-infecção. Outros sinais clínicos inespecíficos das síndromes diarreicas incluem depressão, anorexia, desidratação, pêlo eriçado, sinais característicos de acidose metabólica, vômito e morte (TRAVEN *et al.*, 2001).

IMUNOLOGIA

A resposta imune humoral, em infecções experimentais dos tratos intestinal e respiratório pelo BCoV em bezerros privados de colostro, demonstrou a síntese inicial das imunoglobulinas do isotipo IgA e IgM, que persistiram durante o processo infeccioso (SAIF e SMITH, 1985). Também foi detectada a presença de anticorpos IgG1, induzidos pelas proteínas estruturais N e S do vírus.

Heckert *et al.* (1991) demonstraram que o título da imunidade passiva em bezerros, no momento da infecção pelo BCoV, influencia no desenvolvimento da resposta imune humoral ativa, em um período médio de soroconversão de 28 dias. Nesse estudo, para a caracterização das classes de anticorpos específicos foi realizada a inoculação oral e intranasal de uma suspensão ativa do BCoV produzido em cultivo celular em dois grupos de animais: o grupo 1 recebeu colostro de vacas naturalmente infectadas, com baixa concentração de anticorpos para o BCoV; o grupo 2 recebeu colostro de vacas imunizadas, contendo alto título de anticorpos específicos. Em ambos os colostros fornecidos estavam presentes anticorpos das classes IgG1, IgG2 e IgA, variando apenas o título dos mesmos. Os animais do grupo 2 apresentaram títulos maiores de IgG1 para as glicoproteínas S e HE do que os do grupo 1, porém menor título de anticorpos específicos para as proteínas N e M. Foi constatado ainda que a imunização de vacas até a semana que antecede o final do período de lactação pode induzir anticorpos específicos de maneira semelhante a uma infecção natural.

Estudos anteriores atribuíam à glicoproteína N a característica de ser a proteína mais imunogênica do BCoV. No entanto, Yoo e Deregt (2001) relataram que a glicoproteína de maior imunogenicidade do BCoV é a glicoproteína S. Anticorpos monoclonais para a glicoproteína S reconhecem epítomos conformacionais em dois sítios antigênicos distintos, A e B, como definidos em um ensaio competitivo desenvolvido por Deregt e Babiuki (1987). Ambos os grupos de anticorpos direcionados para esses dois sítios neutralizaram o BCoV em cultura de células. Porém, apenas os anticorpos para o sítio A demonstraram *in vivo* resposta neutralizante, sugerindo que este sítio antigênico da glicoproteína S tenha uma função imunológica importante.

Mapeamentos de complexos antígeno-anticorpo demonstraram que os epítomos reconhecidos por ambos os grupos de anticorpos descritos estão localizados em um fragmento da glicoproteína S, mais especificamente da subunidade S1, entre os aa 351 a 621. Yoo e Deregt (2001) identificaram uma região da subunidade S1, entre os aa 456 a 592, que apresenta importante função na patogênese do BCoV e onde uma simples mutação pode tornar o vírus resistente à ação dos anticorpos neutralizantes.

DIAGNÓSTICO

Mesmo em laboratórios de diagnóstico que adotam como rotina a pesquisa simultânea de diferentes agentes etiológicos envolvidos no complexo das diarreias neonatais em bezerros, em muitos casos, a etiologia não pode ser determinada, sendo necessária a implantação e o constante aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico. Aproximadamente 20 a 30% dos casos de diarreia neonatal em bezerros estão incluídos nesta situação cuja etiologia ou causa permanece de origem desconhecida (SNODGRASS *et al.*, 1986; JANKE, 1989). No Reino Unido, em um estudo relacionado à microbiologia da diarreia dos bezerros, não foi possível a identificação do enteropatógeno em 31% das amostras fecais diarreicas avaliadas (REYNOLDS *et al.*, 1986).

O BCoV pode ser detectado de forma direta, ou indireta pela soroconversão ao vírus. A necessidade de métodos com alta sensibilidade para a detecção do BCoV ocorre principalmente nos animais que estão nas fases precoce e tardia da doença. Esses animais podem eliminar baixos títulos do vírus e ainda apresentar anticorpos pré-existentes, adquiridos de forma passiva ou ativa. A especificidade do método de diagnóstico é igualmente importante para evitar resultados falso-positivos.

A microscopia eletrônica (ME) é uma técnica de diagnóstico utilizada para a identificação direta de partículas do coronavírus em fezes diarreicas. A ME é uma técnica muito utilizada e apresenta boa correlação com outros métodos incluindo os moleculares. Contudo, a presença de estruturas membranosas

pleomórficas, comum nas fezes, semelhantes ao coronavírus pode dificultar a identificação da partícula viral (FUKUTOMI *et al.*, 1999).

O isolamento em cultivo celular é considerado o método padrão-ouro para a detecção do BCoV. A adaptação do vírus em culturas celulares de diferentes linhagens tem sido amplamente estudada há décadas. A utilização da linhagem HRT-18, derivada de um adenocarcinoma retal humano, proporciona maior sucesso no isolamento, propagação e amplificação viral devido ao tropismo do BCoV por essa linhagem celular (TSUNEMITSU *et al.*, 1991). A visualização de efeito citopático (ECP) determinado pela infecção da monocamada celular e a utilização de métodos complementares para a caracterização do vírus confirmam o isolamento viral. O ECP é dependente da presença de enzimas proteolíticas no meio de cultura, como a tripsina. Devido à dificuldade na amplificação viral e por ser uma técnica laboriosa e demorada, o isolamento não é rotineiramente utilizado para o diagnóstico do BCoV. Adicionalmente, o isolamento viral requer laboratórios com infra-estrutura especializada para a realização do cultivo celular (TAHIR, *et al.*, 1995).

Outros métodos de diagnóstico são elaborados com base na propriedade hemaglutinante do vírus. As técnicas da hemaglutinação (HA), da inibição da hemaglutinação (HI) e da Hemadsorção-Eluição-Hemaglutinação (HeHa) são simples e de baixo custo, e possibilitam o processamento de um grande número de amostras clínicas em curto período de tempo. A reação de HA, realizada diretamente em extratos fecais deve ser interpretada com cautela, uma vez que a amostra fecal pode conter hemaglutininas não-específicas que fornecem resultados falso-positivos, ou ainda a presença de IgA de mucosa que pode mascarar o resultado. Contudo a HA, quando utilizada de forma isolada, não é um método de diagnóstico seguro. Em muitos extratos fecais com atividade hemaglutinante não é possível caracterizar a presença de partículas virais por meio da HI com anticorpos contra o BCoV (JEREZ *et al.*, 2002). A HI pode ser efetuada simultaneamente à HA, com o objetivo de aumentar a sua especificidade. Contudo, a presença de imunoglobulinas séricas, adquiridas passivamente pelo colostro, também podem interferir no diagnóstico.

Resultados da utilização de testes imunoenzimáticos, como ELISA, na detecção do BCoV demonstraram alta especificidade, porém baixa sensibilidade (SILVA *et al.*, 1999). Em contraste, um estudo comparativo utilizando suspensão fecal (10%) demonstrou que a sensibilidade do teste foi de 10^4 partículas de BCoV /

ml de suspensão. Comparado à ME, o ELISA apresentou especificidade de 96%. Além de ser um método rápido, essa técnica possibilita a análise simultânea de maior número de amostras, em comparação com outros métodos, sendo útil no monitoramento da infecção em rebanhos (SCHOENTHALER e KAPIL, 1999).

Técnicas como o AST (*Antigen Spot Test*) e a Imunofluorescência Indireta (IFI) também têm sido utilizadas no diagnóstico das diarreias neonatais determinadas pelo BCoV (GABER e KAPIL, 1999). A técnica de imunohistoquímica, quando comparada às técnicas de imunofluorescência direta (IFD) e ME, mostrou-se igualmente útil na detecção de antígeno viral a partir de fragmentos de intestino fixados em formalina (DAR *et al.*, 1998).

A utilização de técnicas moleculares para a detecção de uma sequência conservada do ácido nucleico viral, especificamente a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), tem sido útil na detecção do BCoV em amostras fecais provenientes de bezerros infectados tanto de forma experimental quanto natural. Tsunemitsu *et al.* (1999) descreveram que a RT-PCR apresentou maior sensibilidade quando comparada às técnicas de ELISA e imunomicroscopia eletrônica. De forma semelhante, Cho *et al.* (2001) relatam que a RT-PCR e a nested-PCR foram, respectivamente, 50 e 5.000 vezes mais sensíveis que o ELISA. Takiuchi *et al.* (2006) demonstraram que o sucesso do diagnóstico molecular, principalmente a partir de amostras fecais, está intimamente relacionado a um método adequado de extração do RNA viral e ao desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). Esses autores estabeleceram como região alvo o gene que codifica a glicoproteína N. Além de ser o antígeno mais abundante nas células infectadas pelo vírus, é a porção menos variável entre as estirpes do BCoV. A técnica de multiplex-PCR, para a detecção simultânea de diferentes patógenos virais, também tem sido descrita como possível auxílio no diagnóstico etiológico da infecção (LOA *et al.*, 2006).

TRATAMENTO

O tratamento da diarreia neonatal determinada pelo BCoV é inespecífico e devem ser utilizados procedimentos semelhantes às diarreias

ocasionadas por outros enteropatógenos, como a *E. coli* enterotoxigênica e o rotavírus. A fluidoterapia, tanto de reposição quanto de manutenção, é utilizada como terapia primária.

A correção da acidose metabólica, hipoglicemia e o restabelecimento do estado de hidratação normal tornam-se imperativos. Os bezerros com sinais clínicos superagudos, ou aqueles em decúbito, exigem terapia endovenosa. Mesmo os animais em estação, porém desidratados com mucosas secas, frias e redução ou ausência do reflexo de sucção, também devem receber, inicialmente, uma terapia endovenosa. Os bezerros que apresentam boa resposta de sucção, em geral, podem ser tratados com fluídos orais (SCOTT *et al.*, 2004).

As concentrações dos eletrólitos exigidos, com base em parâmetros clínicos subjetivos, são empíricas na melhor das hipóteses, mas algumas vezes se fazem necessários nas situações de campo. Existem muitos dados de pesquisa e opiniões clínicas individuais acerca do volume mais apropriado da fluidoterapia inicial. A combinação de NaHCO₃ com glicose a 5% pode ser utilizada de 1 a 3 litros de terapia inicial endovenosa, dependendo da gravidade da acidose metabólica. A glicose corrige a hipoglicemia, e tanto o bicarbonato quanto a glicose facilitam o transporte do potássio de volta às células, reduzindo a toxicidade potencial associada à hipercalemia. O benefício do fornecimento de uma solução com glicose é a promoção de um suporte calórico adicional para o bezerro. Alternadamente, os requerimentos nutricionais do animal podem ser alcançados com a continuidade de sua amamentação. Estudos clínicos com bezerros demonstraram que a duração dos quadros diarréicos e a perda de peso corporal foram reduzidas quando a nutrição oral foi mantida durante o tratamento (AVERY e SNYDER, 1990; NAPPERT *et al.*, 1997). Os bezerros inicialmente em decúbito tendem a melhorar após a administração intravenosa de 2 a 4 litros de fluído, podendo ficar em estação dentro de 6 horas (McCLURE, 2001).

Em estudo realizado com 12 bezerros da raça holandesa, separados em dois grupos diferenciados quanto ao tratamento, Arthington *et al.* (2002) avaliaram o uso de soro protéico bovino como suporte à terapia oral. Os animais de ambos os grupos foram inoculados oralmente com BCoV amplificado em cultivo celular. Os animais do grupo tratado com fluidoterapia suplementada com soro bovino apresentaram respiração regular, melhor consistência fecal e regularidade na ingestão de alimento, quando comparados ao grupo não tratado.

De acordo com a disponibilidade de condições favoráveis para a realização do tratamento a fluidoterapia intravenosa pode ser mantida, ou substituída por fluídos orais naqueles bezerros que recuperaram a capacidade de sucção. Porém as fontes eletrolíticas/energéticas orais são menos úteis nas coronaviruses, em razão da patologia distinta nos enterócitos, que resulta em má digestão e má absorção. Contudo, esses cuidados contribuem para o bem-estar do animal durante o período de reparo das células intestinais. A administração de antibióticos sistêmicos ajuda a prevenir a infecção bacteriana secundária, que pode comprometer ainda mais o restabelecimento do bezerro, tornando-se uma possível causa de morte.

CONTROLE E PROFILAXIA

O controle da enfermidade no rebanho é baseado em procedimentos de manejo que diminuam a exposição dos bezerros ao coronavírus. Particularmente em rebanhos com aptidão leiteira, a adoção de medidas como limpeza da maternidade entre os partos de diferentes vacas; remoção imediata do bezerro da mãe para diminuir a exposição às fezes; uso de bezerreiro individual; limpeza e desinfecção rigorosas dos bezerreiros; fornecimento de colostro e leite em recipiente e quantidade adequadas, podem contribuir com a redução dos casos clínicos da doença. Em rebanhos de bovinos de corte, medidas como rodízio dos piquetes de parição para o estabelecimento de vazio sanitário e piquetes de parição separados para as fêmeas primíparas e multíparas também reduzem a incidência e gravidade dos episódios de diarreia.

Ganaba *et al.* (1995) determinaram que a taxa de mortalidade está intimamente relacionada à presença de diarreia no rebanho, principalmente durante as primeiras duas semanas de vida. Geralmente os bezerros acometidos aos 30 dias de idade apresentaram decréscimo no ganho de peso, que não foi compensado no período pós-desmame. Essa perda em ganho de peso também foi demonstrada por Cho *et al.* (2001) ao compararem animais livres e infectados pelo BCoV. Os animais livres tiveram ganho de peso médio superior em 8,2 kg quando comparados aos animais infectados.

A contaminação de objetos inanimados, os pés e mãos e as roupas dos trabalhadores com fezes de um bezerro infectado, têm grande importância na disseminação do vírus no rebanho. Outras medidas de manejo também foram associadas com a prevalência do BCoV no rebanho, como o aumento da densidade animal e uso do mesmo equipamento para o manejo de esterco e de alimentos. O tipo de instalação também foi indicado como possível fator de risco para a infecção pelo BCoV. Quigley *et al.* (1994) demonstraram que animais com até três semanas de idade apresentam maior predisposição às infecções entéricas pelo coronavírus quando abrigados em piquete coletivo do que em baias individuais.

Wood e Payne (1998) analisaram a ação anti-séptica de produtos à base de cloroxilenol, gluconato de clorexidina, amônia quaternária e iodo, e todos mostraram-se eficientes na inativação das partículas virais envelopadas. Porém, o caráter tóxico e a biosseguridade devem ser avaliados quando se introduz qualquer desinfetante no manejo diário do rebanho.

Fatores associados com a periodicidade da enfermidade foram avaliados por Lorino *et al.* (2005) em 92 rebanhos de corte na França. O estudo prospectivo identificou 12 fatores de risco envolvidos na propagação da diarreia neonatal que foram associados ao parto; às condições ambientais; e a profilaxia e alimentação. Segundo os autores, os fatores mais importantes estão relacionados à não vacinação das vacas no terço final de gestação; à presença de alta concentração de amônia nas instalações; e a falta de higiene dos bezerreiros.

O estatus imunológico do neonato é fundamental na redução da gravidade da infecção pelo BCoV. A importância do consumo do colostro no momento e quantidade adequados é amplamente reconhecida como medida indispensável na sanidade animal, por reduzir a morbidade e mortalidade de bezerros. O colostro deve ser fornecido no máximo até três horas após o parto para que não haja falha na transferência de imunidade passiva. A qualidade do colostro é tão importante quanto a quantidade, já que altos títulos de IgA podem determinar o decréscimo dos dias em que o animal permanece doente, além de protegê-lo contra uma possível reinfecção pelo BCoV (HECKERT *et al.*, 1991; EL-KANAWATI *et al.*, 1996).

VACINAÇÃO

A vacinação tem sido indicada como uma forma eficaz de profilaxia da diarreia neonatal bovina. A vacinação das vacas com duas doses de vacina, seis e três semanas antes do parto, e reforço anual também anterior aos partos, é uma importante medida no manejo sanitário, por melhorar a qualidade de colostro fornecido ao neonato (LORINO *et al.*, 2005).

O título viral presente na vacina interfere diretamente no sucesso ou fracasso da imunoprofilaxia. Crouch *et al.* (2001) investigaram a habilidade de uma vacina oleosa contendo o BCoV em aumentar a imunidade lactogênica de bezerros, comparando um grupo de vacas prenhes vacinadas com dose mínima de 190 unidades antigênicas por dose, com outro grupo constituído por vacas prenhes inoculadas com emulsão salina. Os resultados demonstraram que a presença de anticorpos específicos pré-existentes estimula o aumento significativo no título de anticorpos séricos. A resposta vacinal foi rápida e alcançou o pico máximo aproximadamente 14 dias pós-inoculação, mantendo-se por pelo menos mais 84 dias. Outra vantagem observada foi que a resposta imune manteve-se elevada nos casos de infecção presentes no rebanho.

Sugere-se então que a vacinação pode determinar incremento significativo no status imunológico do rebanho. Trabalhos sugerem que vacinas multivalentes, contendo diferentes estirpes do BCoV, promovem melhor proteção quando comparadas às vacinas monovalentes (KAPIL *et al.*, 1999).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados sobre a ocorrência do BCoV em episódios de diarreia neonatal ainda são bastante escassos tanto no Brasil quanto na América do Sul. Desta forma, é de fundamental importância a realização de estudos sobre a ocorrência do vírus em bezerros neonatos, visando contribuir para o conhecimento sobre sua participação nos processos diarreicos.

Considerando ainda a frequência de detecção do BCoV nos episódios de diarreias neonatais em bovinos de aptidão para leite e/ou corte; as dificuldades no diagnóstico etiológico dessa importante virose entérica; a multiplicidade etiológica das diarreias neonatais bovinas; a diversidade de manejos zootécnicos empregados na pecuária bovina nacional; a ubiquidade dos agentes etiológicos; e a diversidade dos fatores predisponentes da infecção, com o objetivo de reduzir os prejuízos econômicos, medidas de controle e profilaxia das infecções ocasionadas pelo BCoV devem ser adotadas e constantemente monitoradas nos rebanhos bovinos brasileiros, particularmente naqueles que se dedicam à criação de animais.

REFERÊNCIAS

AN, S.; CHEN, C.J.; YU, X.; LEIBOWITZ, J.L.; MAKINO, S. Induction of apoptosis in murine coronavirus-infected cultured cells and demonstration of E protein as an apoptosis inducer. **J. Virol.**, v.73, n.9, p.7853-7859, 1999.

ANDERSON, R. e WONG, F. Membrane and phospholipid binding by murine coronaviral nucleocapsid N protein. **Virology**, v.194, p.224–232, 1993.

ARMSTRONG, J.; NIEMANN, H., SMEEKENS, S.; ROTTIER, P.; WARREN, G. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus. **Nature**, v.308, p.751–752, 1984.

ARTHINGTON, J.D.; JAYNES, C.A.; TYLER, H.D. KAPIL, S.; QUIGLEY, J.D. The use of bovine serum protein as an oral support therapy following coronavirus challenge in calves. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p.1249-1254, 2002.

AVERY, M.E. e SNYDER, J.D. Oral therapy for acute diarrhea. The understand simple solution. **New Eng. J. Med.**, v.323, p.891-894, 1990.

CAVANAGH, D. Nidovirales: A new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. **Arch. Virol.**, v.142, p.629–633, 1997.

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. **Arch. Virol.**, v.146, p.2401-2419, 2001.

CHO, K.O.; HOET, A.E.; LOERCH, S.C.; WITTUM, T.E.; SAIF, L.J. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.62(9), p.1436-1441, 2001.

CLARK, M.A. Bovine coronavirus. **Br. Vet. J.**, v.149, p.51-70, 1993.

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

CROUCH, C.F.; OLIVER, S.; HEARLE, D.C.; BUCKLEY, A.; CHAPMAN, A.J.; FRANCIS, M.J. Lactogenic immunity following vaccination of cattle with bovine coronavirus. **Vaccine**, v.19, p.189-196, 2001.

DAR, A.M.; KAPIL, S.; GOYAL, S.M. Comparison of immunohistochemistry, electron microscopy, and direct fluorescent antibody test for the detection of bovine coronavirus. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.10, p.152-157, 1998.

DEREGT, D. e BABIUK, L.A. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus: characteristics and topographical mapping of neutralizing epitopes on the E2 and E3 glycoproteins. **Virology**, v.161, p.410-420, 1987.

DEREGT, D.; GIFFORD, G.A.; KHALID-LIAZ, M.; WATTS, T.C.; GILCHRIST, J.E.; HAINES, D.M.; BABIUK, L.A. Monoclonal antibodies to bovine coronavirus glycoproteins E2 and E3: Demonstration of in vivo neutralizing activity. **J. Gen. Virol.**, v.70, p.993-998, 1989.

DOUGHRI, A.M.; STORZ, J.; HAJER, I.; FERNANDO, H.S. Morphology and morphogenesis of a coronavirus infecting, intestinal epithelial cells of newborn calves. **Exp. Mol. Pathol.**, v.25, p.355-370, 1976.

ELAD, D.; BRENNER, A.; MARKOVICS, B.; YAKOBSON, S.; SHLOMOVITZ, S.; BASAN, J. Yeasts in the gastrointestinal tract of preweaned calves and possible involvement of *Candida glabrata* in neonatal calf diarrhea. **Mycopathologia**, v.141, p.7-14, 1998.

EL-KANAWATI, Z.R.; TSUNEMITSU, H.; SMITH, D.R.; SAIF, L.J. Infection and cross-protection studies of winter dysentery and calf diarrhea bovine coronavirus strains in colostrums-deprived and gnotobiotic calves. **Am. J. Vet. Res.**, v.57(1), p.48-53, 1996.

FAZAKERLEY, J.K.; PARKER, S.E.; BLOOM, F.; BUCHMEIER, M.J. The V5A13.1 envelope glycoprotein deletion mutant of mouse hepatitis virus type-4 is neuroattenuated by its reduced rate of spread in the central nervous system. **Virology**, v.187, p.178-188, 1992.

FUKUTOMI, T.H. TSUNEMITSU, H.; AKASHI, H. Detection of bovine coronaviruses from adult cows with epizootic diarrhea and their antigenic and biological diversities. **Arch. Virol.**, v.144, p.997-1006, 1999.

GABER, F. e KAPIL, S. Development of an antigen spot test for detection of coronavirus in bovine fecal samples. **Clin. Diag. Lab. Immun.**, v.6(4), p.542-544, 1999.

GANABA, R.; POULIN, M.B.; BÉLANGER, D.; COUTURE, Y. Description of cow-calf productivity in Northwester Quebec an path models for calf mortality and growth. **Prev. Vet. Med.**, v.24, p.31-42, 1995.

GONZALES, J.M; GOMEZ-PUERTAS, P.; CAVANAGH, D.; GORBALENYA, A.E.; ENJUANES, L.A. A comparative sequence analysis to revise the current taxonomy of the family *Coronaviridae*. **Arch. Virol.**, v.148 (11), p.2207-2235, 2003.

de GROOT, R.J.; LUYTIES, W.; HORZINEK, M.C.; VAN DER ZEIJST, B.A.; SPAAN, W.J.; LENSTRA, J.A. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses. **J. Mol. Biol.**, v.196, p.963–966, 1987.

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

HAZOCSUZ, M.; SREEVATSAN, S.; CHO, K.O.; HOET, A.E.; SAIF, L.J. Molecular analysis of the S1 subunit of the spike glycoprotein of respiratory and enteric bovine coronavirus isolates. **Vir. Res.**, v. 84, p.101-109, 2002.

HECKERT, R.A.; SAIF, L.J.; MYERS, G.W.; AGNES, A.G. Epidemiologic factors and isotype-especific antibody responses in serum and mucosal secretions of dairy calves with bovine coronavirus respiratory tract and enteric tract infections. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.845-851, 1991.

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

HINGLEY, S.T.; GOMBOLD, J.L.; LAVI, E; WEISS, S.R. MHV-A59 fusion mutants are attenuated and display altered hepatotropism. **Virology**, v.200, p.1–10, 1994.

HOUSE, J.A. Economic impact of rotaviruses and other neonatal disease agents of animals. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.173(5), p.573-576, 1978.

JANKE, B.H. Symposium on neonatal calf diarrhoea. **Vet. Med.**, v.84, p.803-810, 1989.

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

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

KHALILI, M.; MORSHEDI, A.; KEYVANFAR, H.; HEMMATZADEH, F. Detection of bovine coronavirus by RT-PCR in a field study. **Vet. Arhiv.**, v.76(4), p.291-296, 2006.

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

LAI, M.C.M.; CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Vir. Res.**, v.48, p.1-100, 1997.

LAI, M.M.; HOLMES, K.V. *Coronaviridae*: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWELY, P.M. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, p.1163-1186, 2001.

LANGPAP, T.J.; BERGELAND, M.E.; REED, D.E. Coronaviral enteritis of young calves: Virologic and pathologic findings in naturally occurring infections. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, p.1476-1478, 1979.

LEWIS, L.D. e PHILIPS, R.W. Pathophysiologic changes due to coronaviruses-induced diarrhoea in the calf. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.173, p.636-642, 1978.

LIN, X.; O'REILLY, K.L.; STORZ, J. infection of polarized epithelia cells with enteric and respiratory tract bovine coronaviruses and release of virus progeny. **Am. J. Vet. Res.**, v.58, p.1120-1124, 1997.

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

LORINO, T.; DAUDIN, J.J.; ROBIN, S.; SANAA, M. Factors associated with time to neonatal diarrhea in French beef calves. **Prev. Vet. Med.**, v.68, p.91-102, 2005.

McCLURE, J.T. Oral fluid therapy for treatment of neonatal diarrhoea in calves. **Vet. J.**, v.162, p.87-89, 2001.

MOTHA, M.X.J e HANSEN, M.F. Prevalence of IBR, PI 3, BRS and BCV infections in the dairy cattle population of New Zealand. **New Zeal. Vet. J.**, v.46, p.239-240, 1998.

NAPPERT, G.; ZELLO, G.A.; NAYLOR, J.M. Oral rehydration therapy for diarrheic calves. **Comp. Edu. Pract. Vet.**, v.19, p.181-189, 1997.

PAUL, P.S. e LYOO, Y.S. Immunogens of rotaviruses. **Vet. Microbiol.**, v.37, p.299-317, 1993.

PETERSON, M.W.; SPENDLOVE, R.S.; SMART, R.A. Detection of neonatal calf diarrhea virus, infant reovirus-like diarrhea, and a coronavirus using the fluorescent virus precipitin test. **Am Soc Microbiol**, v. 3(3), p. 376-377, 1976.

POPOVA, R. e ZHANG, X. The spike but not the hemagglutinin/esterase protein of bovine coronavirus is necessary and sufficient for viral infection. **Virology**, v.294, p.222-236, 2002.

QUIGLEY, J.D.; MARTIN, K.R.; BEMIS, D.A.; POTGIETER, L.N.D.; REINEMERGER, C.R.; ROHRBACH, B.W.; DOWLEN, H.H.; LAMAR, K.C. Effects of housing and colostrums feeding on serum immunoglobulins, growth and fecal scores of Jersey calves. **J. Dairy Sci.**, v.77, p.3124-3131, 1994.

REYNOLDS, D.J.; MORGAN, J.H.; CHANTER N.; JONES, P.W.; BRIDGER, J.C.; DEBNEY, T.G.; BUNCH, K.J. Microbiology of calf diarrhoea in Southern Britain. **Vet. Rec.**, v.119, p.34-39, 1986.

SAIF, L.J e SMITH, K.L. Enteric viral infections of calves and passive immunity. **J. Dairy Sci.**, v.68, p.206-228, 1985.

SCHOENTHALER, S.L. e KAPIL, S. Development and Applications of a Bovine Coronavirus Antigen Detection Enzyme-Linked Immunosorbent Assay . **Clin. Diag. Lab. Immun.**, v.6(1), p.130-132, 1999.

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

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: Blackwell Science Ltd, p.185-214, 2004.

SILVA, M.R., O'REILLY, K.L., LIN, X., STINE, L., STORZ, J. Sensitivity comparison for detection of respiratory bovine coronaviruses in nasal samples from feedlot cattle by ELISA and isolation with the G clone of HRT-18 cells. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.11, p.15–19, 1999.

SNODGRASS, D.R.; TERZOLO, H.R.; SHERWOOD, D.; CAMPBELL, I.; MENZIES, J.D.; SYNGE, B.A. Aetiology of diarrhoea in young calves. **Vet. Rec.**, v.12, p.31-34, 1986.

SPAAN, W.; CAVANAGH, D.; HORZINEK, M.C. Coronaviruses: structure and genome expression. **J. Gen. Virol.**, v.69, p.2939-2952, 1988.

STEPHENS, E.B. e COMPANS, R.W. Nonpolarized expression of a secreted murine leukemia virus glycoprotein in polarized epithelial cells. **Cell**, v.47, p.1053-1059, 1986.

TAHIR, R.A.; POMEROY, K.A.; GOYAL, S.M. Evaluation of shell via cell culture technique for the detection of bovine coronavirus. **J. Vet. Diag. Invest.**, v.7, p.301-304, 1995.

TAKIUCHI, E.; STIPP, D.T.; ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. **J. Virol. Methods**, v.131, p.148-154, 2006.

TRAVEN, M.; BJÖRNEROT, L.; LARSSON, B. Nationwide survey of antibodies to bovine coronavirus in bulk milk from Swedish dairy herds. **Vet. Rec.**, v.8, p.527-529, 1999.

TRAVEN, M.; NÄSLUND, K.; LINDE, N.; LINDE, B.; SILVÁN, A.; FOSSUN, C.; HEDLUND, K.O.; LARSSON, B. Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV – comparison with BCV infection in milk-fed calves. **Vet. Microbiol.**, v.81, p.127-151, 2001.

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

TSUNEMITSU, H.; SMITH, D.R.; SAIF, L.J. Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. **Arch. Virol.**, v.144, p.167-175, 1999.

VENDE, P.; KAROUM, R.; MANET, G.; RIZET, C.; SCHEICHER, F.; COHEN, J.; NAVET, H. Molecular epidemiology of bovine rotaviruses from the Charolais area. **Vet. Res.**, v.30, p.451-456, 1999.

VLASAK, R.; LUYTIES, W.; LEIDER, J.; SPAAN, W.; PALESE, P. The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetylesterase activity. **J. Virol.**, v.62, p.4686-4690, 1988.

YOO, D. e DEREGT, D. A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. **Clin. Diag. Lab. Immun.**, v.8(2), p.297-302, 2001.

WOOD, A. e PAYNE, D. The action of three antiseptic/disinfectants against enveloped and non-enveloped viruses. **J. Hosp. Infect.**, v.38, p.283-295, 1998.

WOODE, G.N. e BRIDGER, J.C. Viral enteritis of calves. **Vet. Rec.**, v.96, p.85-88, 1975.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a ocorrência do coronavírus bovino em amostras fecais de bezerros com até 60 dias de idade provenientes de rebanhos de corte e leite dos Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o BCoV por meio da técnica de SN-PCR, em uma coleção de amostras fecais diarréicas e não-diarréicas de bezerros.
- Relacionar a consistência fecal (líquida, pastosa e normal) com a taxa de detecção do BCoV.
- Determinar a faixa etária de maior ocorrência da coronavirose bovina em bezerros com diarreia.
- Isolar em cultivo de células HRT-18 estirpes do BCoV à partir de amostras de fezes diarréicas de bezerros naturalmente infectados.
- Caracterizar molecularmente as estirpes de BCoV isolados em cultivo celular por meio do seqüenciamento de um produto amplificado do gene da nucleoproteína viral.

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

**3.1. FREQUENCY OF BOVINE CORONAVIRUS DETECTED BY SEMI-
NESTED PCR IN FECAL SAMPLES OF CALVES
FROM BRAZILIAN CATTLE HERDS.**

Frequency of bovine coronavirus detected by semi-nested PCR in fecal samples of calves from Brazilian cattle herds.

Abstract:

The bovine coronavirus (BCoV) is an important etiological agent of viral diarrhea in calves from beef and dairy cattle herds worldwide. The aim of this study was to determine the occurrence of BCoV in fecal samples and epidemiological aspects of the infections in Brazilian cattle herds. The frequency of BCoV infection was evaluated in 282 fecal samples (221 diarrheic; 61 non-diarrheic) from calves up to 60-days-old from beef and dairy cattle herds. The calves were from four Brazilian States (São Paulo, Paraná, Minas Gerais, and Mato Grosso) in three (South, Southeast, Center-West) geographical regions. A semi nested-PCR assay was used to detection of a highly conserved region of the BCoV nucleoprotein gene. The rate of BCoV detection in diarrheic fecal samples (19.8%) was significantly higher ($p=0.0027$) than in feces with normal consistency (3.2%). The infection was detected in all age groups with greater prevalence ($p= 0.0012$) in calves with 16 to 30-days-old. The detection of the BCoV infection in beef and dairy calves from all geographical regions evaluated, and the rate of BCoV positive diarrheic fecal samples showed that this enteric infection is a frequent cause of neonatal calf diarrhea in Brazilian cattle herds.

Keywords: neonatal calf diarrhea, bovine coronavirus, diagnosis, SN-PCR.

Freqüência do coronavírus bovino detectado pela semi-nested PCR em amostras fecais de bezerros provenientes de rebanhos bovinos brasileiros.

Resumo

O coronavírus bovino (BCoV) é um importante agente etiológico de diarreia viral em bezerros de rebanhos de leite e de corte em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi avaliar alguns aspectos epidemiológicos da infecção pelo BCoV nos rebanhos bovinos brasileiros. A frequência da infecção foi avaliada em 282 amostras fecais (221 diarreicas; 61 não-diarreicas) de bezerros com até 60 dias de idade provenientes de rebanhos leiteiros e de corte. Os animais eram pertencentes a quatro Estados brasileiros (São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Mato Grosso), correspondendo a três regiões geográficas (Sul, Sudeste, Centro-Oeste). Foi utilizada a técnica de semi-nested PCR para a detecção da região altamente conservada do gene que codifica a nucleoproteína do BCoV. A taxa de detecção do BCoV nas amostras diarreicas (19,8%) foi significativamente superior ($p=0,0027$) que em fezes de consistência normal (3,2%). A infecção foi detectada em bezerros de todas as faixas etárias analisadas com maior prevalência ($p= 0,0012$) em bezerros entre 16 e 30 dias de idade. A detecção do BCoV em amostras fecais de bezerros provenientes de rebanhos de leite e de corte de todas as regiões geográficas pesquisadas e o número de amostras diarreicas positivas para o BCoV demonstram que esta infecção entérica é uma freqüente causa da diarreia neonatal nos rebanhos bovinos brasileiros.

Palavras-chave: diarreia neonatal bovina, coronavírus bovino, diagnóstico, SN-PCR.

Introduction

Diarrhea in young pre-weaned calves is one of the most important causes of calf morbidity and mortality, resulting in significant economic losses in dairy and beef cattle herds worldwide. The etiology of neonatal calf diarrhea is complex and multifactorial with the involvement of infectious and non-infectious (environmental, managerial, nutritional and physiological) factors (PAUL and LYOO, 1993). These factors can act either simple or in combination. Frequent consequences of neonatal calf diarrhea are the costs of treatment, poor growth rate, and increase of susceptibility to other infections, especially to the respiratory tract (PÉREZ et al., 1998). It has been estimated that neonatal calf diarrhea accounts for approximately 75% of the mortality rate in calves under 3 weeks of age (RADOSTITS et al., 1994). Moreover, the possible long-term effects of the disease on the health and performance of calves that survived from the illness might constitute to greater losses (WARNICK et al., 1995).

The etiology of infectious diarrhea has been attributed to several agents such as bacteria, fungus, protozoan and virus. Rotavirus, coronavirus, calicivirus, parvovirus, torovirus, and astrovirus, have been considered common and widespread causes of viral enteric illness in newborn of mammalian and avian species worldwide (DUCKMANTON et al., 1998; VAN DER POEL et al., 2000; TAMEHIRO et al., 2003; BARREIROS et al., 2004).

Bovine coronavirus (BCoV) is a member of the order *Nidovirales*, *Coronaviridae* family that possesses a single-stranded, non-segmented RNA genome of positive polarity (LAI and CAVANAGH, 1997). Diarrhea caused by BCoV has been clinically significant in cattle herds worldwide. The virus may also infect the respiratory tract of calves and feedlot cattle, and has been associated with winter

dysentery in adult cattle. BCoV has worldwide distribution and prevalence have ranged from 11 to 81%, accentuating the importance of the coronavirus over the herd healthy (SVOBODA, 1986; MOTHA and HANSEN 1998; PÉREZ et al., 1998).

Few detailed studies have been performed considering the prevalence of BCoV infection and the role played by the virus in the etiology of neonatal calf diarrhea in Brazilian cattle herds (JEREZ et al., 2002; TAKIUCHI et al., 2006). Epidemiological studies may represent an important tool for control strategies, developing most, as well as the management of prophylaxis and preventive measures. Consequently, the aim of this study is to provide epidemiological data of BCoV infection through virus detection by semi-nested PCR (SN-PCR) assay in diarrheic fecal specimens from calves of beef and dairy cattle herds from four Brazilian states.

Material and methods

Virus and cells

The BCoV Kakegawa strain was propagated in human rectal tumor – 18 (HRT-18) cells and used in SN-PCR assay as positive control in all reactions. HRT-18 cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle Media (D-MEM, Gibco BRL, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, USA), 55 µg/ml gentamicin (Sigma Co., USA) and 2.5 µg/ml amphotericin B (Bristol-Meyers Squibb, Brazil).

Fecal specimens

From March to December 2004, 282 fecal specimens from beef and dairy cattle herds of four Brazilian States [Paraná (PR), $n=47$; São Paulo (SP), $n=19$; Minas Gerais (MG), $n=11$; and Mato Grosso (MT), $n=144$] were evaluated. The fecal samples were collected from calves varying from 1 to 60 days old. Two hundred and twenty one (221/282) samples were collected from calves with clinical signs of diarrhea. Stool samples were considered as diarrheic when fecal consistency varied macroscopically from pasty to liquid. Sixty one samples (61/282) collected from asymptomatic calves were included in this study and formed the control group.

Stool suspensions were prepared as 20% (w/v) in 0.01M phosphate-buffered saline pH 7.2 (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 15 mM KH₂PO₄). The suspensions were centrifuged at 3.000 *g* for 15 min at 4°C, and stored at 4 °C.

RNA Extraction

Aliquots of 400 µl of stool suspensions were treated with SDS at a final concentration of 1% (v/v), homogenized by vortexing, and kept at 56 °C for 30 min. For RNA extraction a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidinium isothiocyanate methods was performed as previously described (BARREIROS et al., 2004). Aliquots of diethyl-pyrocabonate (DEPC) treated sterile water were included as negative controls in all RNA extraction procedures.

SN-PCR

The primers used in this study were designed to amplify a 454 bp (RT-PCR) and 251 bp (SN-PCR) length amplicon from the nucleocapsid (N) gene of the BCoV Mebus strain. The sequence of the oligonucleotide primers were: BCoV1 forward (nt 504–521) 5'-CGATGAGGCTATTCCGAC-3', and BCoV2 reverse (nt 940–957) 5'-TGTGGGTGCGAGTTCTGC-3' for the RT-PCR reaction; and BCoV3 forward (nt 707–725) 5'-TTGCTAGTCTTGTCTGGC-3', and BCoV2 reverse for the SN-PCR reaction. The RT-PCR and SN-PCR were carried out as previously described (TAKIUCHI et al., 2006).

The products were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel with ethidium bromide (0.5 µg/ml) in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), and visualized under UV light.

The specificity of the 251 bp length amplicons (SN-PCR) was confirmed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *Hae* III enzyme (Invitrogen™ Life Technologies, USA).

Statistical analysis

The Chi-square (χ^2) test was used at 5% significance to assess the differences among the proportions of faecal samples positive or negative to BCoV and variables such as feces characteristic (diarrhea/normal) and age group of the animals studied. The Epi Info™ 6.04d (Dean *et al.*, 1998) program was used to perform the statistical calculations.

Results

The SN-PCR detected the N gene of BCoV in 19.8% (42/221) diarrheic fecal specimens. For the control group ($n = 61$), BCoV was detected only in two non-diarrheic fecal samples. The virus was detected in calves from all Brazilian States included for sampling (Table 1).

When the consistency of diarrheic feces was evaluated, the rate of BCoV detection was significantly greater ($p = 0.0036$) in pasty feces (Table 2). However, when only BCoV positive feces were considered ($n = 44$; 42 diarrheic and 2 non-diarrheic), 54.5% (24/44) demonstrated liquid consistency. The percentage of BCoV positives fecal samples by the age-group, was more significant in 16 to 30-days-old calves (29.8%), been statistically different ($p = 0.0012$) from the other studied groups.

Positive relations ($P < 0,05$) was observed between BCoV detection and both fecal consistency and calves age (Table 3). In comparison with negative SN-PCR results, BCoV was more frequent in pasty diarrheic feces ($p = 0.0036$), and in fecal samples of calves with 16–30 days old ($p = 0.0050$). No significant relation was observed between BCoV positive rate in pasty or liquid diarrheic feces ($p = 0.7141$).

Table 1. Detection of BCoV by SN-PCR assay in diarrheic fecal specimens from calves in Brazilian cattle herds.

SN-PCR	Brazilian State				
	PR	SP	MG	MT	Total
Positive	8 (17.0)	6 (31.6)	7 (63.6)	21 (14.5)	42 (19.8)
Negative	39 (83.0)	13 (68.4)	4 (36.4)	123 (85.5)	179 (80.2)
Total	47	19	11	144	221

Table 2. Relationship between fecal consistency and rate of bovine coronavirus detection by SN-PCR assay in fecal samples from calves up to 60 days-old.

SN-PCR	Fecal consistency (%)			Total
	Normal	Pasty	Liquid	
Positive	2 (3.2) ^{a,b}	18 (20.0) ^a	24 (18.4) ^b	44 (15.6)
Negative	59 (96.8)	72 (80,0)	107 (81.6)	238 (84.4)

^a $P < 0.003$; ^b $P < 0.005$ (Exact Fisher's text).

Table 3. Distribution of SN-PCR results for BCoV detection in fecal samples from calves by age groups.

Age groups (days)	Diarrheic fecal specimens (%)		Total
	Positive	Negative	
1 – 15	1 (11.2)	8 (88.8)	9
16 – 30	29 (29.8) ^a	68 (70,2)	97
31 – 45	9 (10.4) ^a	77(89.6)	86
46 – 60	3 (10.3)	26 (89.7)	29

^a $P < 0.002$ (Exact Fisher's text).

Discussion

Epidemiological studies of enteric BCoV infections in Brazil and even in South America cattle herds are sporadic (JEREZ et al., 2002; TAKIUCHI et al., 2006). Thus, this study was performed to observe the involvement and the role played by BCoV in neonatal calf diarrhea from Brazilian cattle herds. Three Brazilian geographical regions were evaluated; South (PR), Southeast (SP and MG), and Center-West (MT). The rate (31,6%) of BCoV positive fecal samples collected from calves in SP State is similar to results of Jerez et al. (2002), who related that the BCoV prevalence rate is

about 39% (28/72), detected by HA / HI tests in 16 herds of the State. Based on the aptitude of the herds, in both studies BCoV was detected even in fecal samples from beef or/and dairy cattle herds. The percentage of BCoV positive fecal specimens by SN-PCR assay varied from 14.5% (MT) to 63.6% (MG), suggesting that BCoV is probably disseminated in some Brazilian cattle herds, thereby participating in the etiology of neonatal calf diarrhea in our country.

Twenty percent (18/90) of stool samples with pasty consistency and 18% (21/133) of liquid feces from diarrheic calves were BCoV positive by SN-PCR. No statistic relation ($p = 0.71412$) between diarrheic feces consistency (pasty and liquid) of SN-PCR BCoV detection was observed. Lucchelli et al. (1992) also observed no statistic correlation between pasty [23.4% (22/94)] and liquid feces [28.3% (13/46)] of group A bovine rotavirus detection ($p=0.63142$), another important viral etiology of neonatal diarrhea in cattle herds. Alternatively that, rotavirus was detected in 10.7% (29/271) of non-diarrheic feces, been different from others to the prevalence of rotavirus in normal fecal samples were 18.3% (9/49) and 2.2% (6/279) (SNODGRASS *et al.*, 1986; ALFIERI *et al.*, 2006).

Differing from group A bovine rotavirus calf diarrhea data mentioned before, in the present study BCoV was detected in only 1.6% (2/61) of non-diarrheic feces. The detection rate of BCoV in asymptomatic calves may be influenced by several factors, such as prevalence of the disease, age of the animal, immune status, diagnostic method, and period when specimens are sampled after BCoV infection. In addition, BCoV infected calves may have presented diarrhea either before or after sample collections, as well as they may be infected and not demonstrated clinical signs of diarrhea. Viral load and virulence, passive immune status, environmental and

managerial factors may moderate the clinical severity of BCoV infections under field conditions (SNODGRASS et al., 1986).

The age of the calves in this study was associated with positive results in SN-PCR BCoV detection from diarrheic specimens. The prevalence of BCoV was greater ($p = 0.0012$) in feces of 16 – 30-days-old calves. The average of calves for coronavirus shedding has ranged from 15 to 18 days (JEREZ et al. 2002; HECKERT et al., 1990). It is also known that BCoV may infect young calves that are from 1 to 30 days old (CLARK, 1993).

Although BCoV has been established as an agent of diarrhea in calves, its prevalence has been investigated only in a limited extent because of the difficulties and limitations of diagnostic techniques. Sensitive techniques for BCoV detection must be used to allow conclusive investigation, as well as epidemiological studies, especially from fecal samples of calves at early or late stages of disease when they demonstrate low levels of viral particles. Assay with specificity is equally important to avoid false-positive results.

Consequently, the RT-PCR followed by SN-PCR assays may be a useful tool for the diagnosis of BCoV in feces from naturally infected calves. Cho et al. (2001) reported that RT-PCR and nested PCR, respectively, were 50 and 5000 times more sensitive than the antigen-capture ELISA. Sensitive and specific diagnostic techniques, such as the SN-PCR, represent an indispensable tool in BCoV epidemiological studies, determining its relationship with the etiology of neonatal calf diarrhea. The sensitivity and specificity of the SN-PCR used in this study were assured by BCoV detection from feces of naturally infected calves, in agreement with Takiuchi et al. (2006) (Fig. 1). Besides this, the primers were designed from the highly conserved region of the N gene of the Mebus strain. Since this gene is the

most abundant protein representing a good marker for BCoV infection (HISCOX et al., 2001; TAKIUCHI et al., 2006).

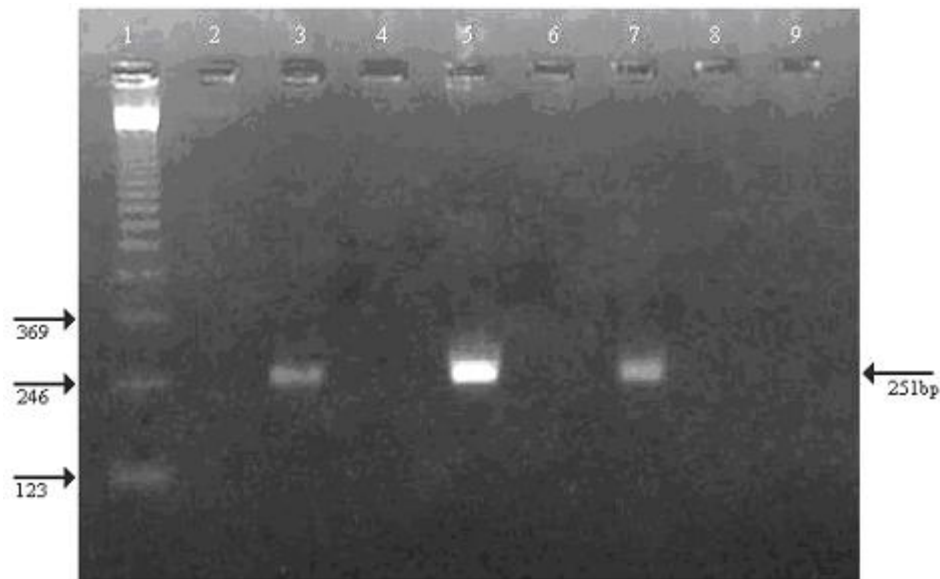


Fig. 1. Semi-nested PCR of bovine Coronavirus N gene in fecal specimens from calves in Brazilian cattle herds. Lane 1: ladder, 123 bp (Invitrogen™ Life Technology, USA); lanes 3 and 4: liquid fecal samples; lanes 5 and 6: pasty fecal samples; lanes 7 and 8: normal control fecal samples; lanes 2 and 9: negative controls.

In order to devise preventive measures and reduce losses during the initial months of life, it is important to identify the etiological factors involved in neonatal calf diarrhea, as well as to increase the success of control and prophylaxis measures. These measure may increase productivity per livestock unit without increasing livestock numbers (PÉREZ *et al.*, 1998). For that, is necessary a highly sensitive and specific diagnostic technique to avoid false-positive and negative results.

The definite diagnosis of BCoV enteritis is laboratorial. Clinical manifestations and the pathological alterations do not allow for diagnosis, since these alterations are produced by other etiological agents (VARGAS et al., 1990). HA assay has been

widely and routinely used for BCoV detection. However, the low sensitivity of the HA assay makes it unable to detect very low titers of BCoV when compared with ELISA (GABER and KAPIL, 1999; SCHOENTHALER et al., 1999). Molecular diagnostic techniques are preferred to avoid false-positive and negative results (TAKIUCHI *et al.*, 2006). Besides, HA test performed directly with the fecal samples, must be carefully interpreted since the feces contain non-specific hemagglutinins providing false-positive results (SATO *et al.*, 1977). Besides, the presence of colostral IgG1 and local IgA in feces may interfere over the results. Due to limitations of common diagnostic methods used in routine laboratorial, such as ELISA and HA/HI tests, the use of RT and SN-PCR assay provides a sensitive, specific and fast method for BCoV diagnosis, been able to detect the prevalence of BCoV infections in cattle herds.

The present study revealed a more prominent rate of BCoV detection in diarrheic fecal samples (19.8%), been significantly higher ($p=0.0027$) than in feces with normal consistency (3.2%). The infection was detected in all age groups evaluated with greater prevalence ($p= 0.0012$) in calves with 16 to 30-days-old. More studies about this agent should be performed in order to supply the lack of knowledge about its occurrence in singular and mixed infections in neonatal diarrhea episodes from Brazilian cattle herds. Considering that the neonatal diarrhea is the main cause of morbidity and mortality in newborn calves, improvement in control strategies, and preventive and prophylaxis measures for BCoV should be implemented to decrease calf morbidity and, consecutively, mortality in cattle herds.

References

- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Trop. Anim. Health. Prod.**, v.38, p.521-526, 2006.
- BARREIROS, M.A., ALFIERI, A F, MEDICI, K C, LEITE, J P, ALFIERI, A A. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1] G6) rotavirus strain. **J. Vet. Med. B**, v.51, p.104–109, 2004.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.495–503, 1990.
- 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. **Arch. Vir.**, v.146, p.2401-2419, 2001.
- CLARK, M.A. Bovine coronavirus. **Brit. Vet. J.**, v.149, p.51-70, 1993.
- DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D.; BURTON, A.H.; BRENDEL, K.A.; SMITH, D.C.; DICKER, R.C.; SULLIVAN, K.M.; FAGAN, R.F.; ARNE, T.G. 1998. **Epi Info versão 6.04**. Disponível em <www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/EI6dnjp.htm>.
- DE LA FUENTE, R.; GARCÍA, A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; LUZÓN, M.; CID, D.; GARCÍA, J.A.; ORDEN, M.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Proportional morbidity rates of enteropathogens among diarrheic dairy calves in central Spain. **Prev. Vet. Med.**, v.36, p.145-152, 1998.
- DUCKMANTON, L.; CARMAN, S.; NAGY, E.; PETRIC, M. Detection of bovine coronavirus in fecal specimens of calves with diarrhea from Ontario farms. **J. Clin. Microbiol.**, v.36, p.1266–1270, 1998.
- GABER, F and KAPIL, S. Development of an antigen spot test for detection of coronavirus in bovine fecal samples. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.6, p.542-544. 1999.
- HECKERT, R.A.; SAIF, L.J.; HOBLET, K.H.; AGNES, A.G. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds of Ohio. **Vet. Microbiol.**, v.22, p.187-201, 1990.
- HEINRICHS, A.J. and RADOSTIS, O.M. Health management of dairy calves. In: RADOSTIS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. **Herd health food animal production medicine**. Philadelphia: Saunders, p.183-213, 1994.
- HISCOX, J.A.; WURM, T.; WILSON, L.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D.; BROOKS, G. The coronavirus infectious bronchitis virus nucleoprotein localises to the nucleolus. **J. Vir.**, v.75, p.506-512, 2001.

HOUSE, J A. Economic impact of rotaviruses and other neonatal disease agents of animals. **J. Am. Vet. Med. Ass.**, v.173(5), p.573-576, 1978.

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

LAI, M.M.C. and CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v.48, p.1-100, 1997.

LUCHELLI, A.; LANCE, S.E.; BARLETT, P.B.; MILLER, G.Y.; SAIF, L.J. Prevalence of bovine group A rotavirus shedding among dairy calves in Ohio. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.169-174, 1992.

MOTHA, M.X.J. and HANSEN, M.F. Prevalence of IBR, PI 3, BRS and BCV infections in the dairy cattle population of New Zealand. **New Zeal. Vet. J.**, v.46, p.239-240, 1998.

PAUL, P.S. and LYOO, Y.S. Immunogens of rotaviruses. **Vet. Microbiol.**, v.37, p.299-317, 1993.

PÉREZ, E.; KUMMELING, A.; JANSSEN, M.M.H.; JIMÉNEZ, C.; ALVARADO, R.; CABALLERO, M.; DONADO, P.; DWINGER, R.H. Infectious agents associated with diarrhea of calves in the canton of Tilarán, Costa Rica. **Prev. Vet. Med.**, v.33, p.195-205, 1998.

REYNOLDS, D.J.; MORGAN, J.H.; CHANTER N.; JONES, P.W.; BRIDGER, J.C.; DEBNEY, T.G.; BUNCH, K.J. Microbiology of calf diarrhoea in Southern Britain. **Vet. Rec.**, v.119, p.34-39, 1986.

SAIF, L.J. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? **Corn. Vet.**, v.80, p.303-311, 1990.

SAIF, L.J.; REDMAN, D.R.; MOREHEAD, P.D.; THEIL, K.W. Experimental coronavirus infections in calves: Viral replication in the respiratory and intestinal tracts. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p. 1426-1432, 1986.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.1, 1989.

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

SCHOENTHALER, S.L. and KAPIL, S. Development and applications of a bovine coronavirus antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.6, p.130-132, 1999.

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

SVOBODA, I.; RODAK, L.; FRANZ, J. Differential diagnosis of viral diarrhea in calves. **Vet. Med.**, v.31, p.497-504, 1986.

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. **J. Virol. Meth.**, v.131, p.148-154, 2006.

TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in faecal samples from broiler chicken. **Braz. J. Microbiol.**, v.34, p.349-353, 2003.

VAN DER POEL, W.H.M.; VINI'É, J.; VAN DER HEIDE, R.; HERRERA, M.I.; VIVO, A.; KOOPMANS, M.P.G. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. **Emerging Infect. Dis.** v.6, p.36-41, 2000.

VARGAS, J.D.; HERNÁNDEZ, H.; ANES, F. Incidencia de rotavírus en las diarreas de la costa oriental del lago Maracaibo, Venezuela. **Vet. Mex.**, v.21, p.123-127, 1990.

WARNICK, L.D.; ERB, H.N.; WHITE, M.E. Lack of association between calf morbidity and subsequent first lactation milk production in 25 New York holstein. **J. Dairy Sci.**, v.78, p.2819-2830, 1995.

**3.2. ISOLATION OF BRAZILIAN WILD-TYPE BOVINE CORONAVIRUS
STRAIN IN HRT-18 CELLS FROM DIARRHEIC FECES OF
NATURALLY INFECTED CALVES.**

Isolation of Brazilian wild-type bovine coronavirus strain in HRT-18 cells from diarrheic feces of naturally infected calves.

Abstract:

The neonatal calf diarrhea is the most representative form of the bovine coronavirus (BCoV) infection in beef and dairy cattle herds worldwide. For the BCoV infection diagnosis several methods were developed such as electron microscopy, hemagglutination (HA) / hemagglutination inhibition (HI), ELISA, and RT-PCR / SN-PCR assay. BCoV isolation in cell culture is a difficult technique for the diagnosis of neonatal calf diarrhea. However, virus isolation is an important source of wild-type BCoV strains for antigenic and molecular characterization, evaluation of biological activities, and pathological studies with biological model. The aim of this paper was to report the isolation of wild-type BCoV strains in human rectal tumor (HRT-18) cells from diarrheic fecal specimens of naturally infected calves. Stool samples, previously known to be BCoV positives by SN-PCR were obtained from three calves up to 30-days-old with clinical signs of diarrhea. The monolayers of HRT-18 cells were infected with suspensions (10-20% w/v) of fecal samples in Dulbecco's media, previously treated with antibiotics and trypsin (5 µg/ml). The inoculated HRT-18 cells were kept in a roller drum at 37°C, and examined daily for cytopathic effects (CPE). Every 5 days a blind passage was accomplished. In the third passage two samples showed CPE suggesting BCoV. After 3 freeze-thaw cycles the third passage of this two samples showed hemagglutination titers of 16 and 32 units. The SN-PCR assay amplified a fragment of the BCoV N gene with 251 bp of the two wild-type and Mebus strains. The specificity of the SN-PCR amplicons were firstly confirmed by RFLP with *Hae* III enzyme and, in addition, purified and submitted to DNA sequencing. Both techniques, RFLP and sequencing, confirmed that the 251 bp amplicons were BCoV, presenting, respectively, 99% and 97% of similarity between the BCoV isolates and Mebus strain. The isolation of Brazilian strains of BCoV is important for the accomplishment of studies for the evaluation of diagnosis methods as well as the control measures, including vaccination program in beef and dairy cattle herds.

Keywords: neonatal calf diarrhea, bovine coronavirus, diagnosis, virus isolation.

Isolamento de estirpe selvagem do coronavírus bovino em células HRT-18 a partir de fezes diarréicas de bezerros naturalmente infectados.

Resumo:

A diarreia neonatal bovina é a mais representativa forma da infecção determinada pelo coronavírus bovino (BCoV) em rebanhos de corte e de leite em todo o mundo. Para o diagnóstico da infecção determinada pelo BCoV vários métodos foram desenvolvidos como a microscopia eletrônica, hemaglutinação (HA) / inibição da hemaglutinação (HI), ELISA e técnicas moleculares como a RT-PCR / SN-PCR. O isolamento do BCoV em cultura celular é uma técnica demorada para o diagnóstico etiológico da diarreia neonatal bovina. No entanto, o isolamento viral é uma importante ferramenta para estudos antigênicos e caracterização molecular de estirpes selvagens de BCoV, além da possibilidade da avaliação da atividade biológica e realização de estudos de inoculação experimental do vírus utilizando modelos biológicos. O objetivo deste trabalho foi relatar o isolamento de estirpes selvagens do BCoV em células de adenocarcinoma retal humano (HRT-18) a partir de espécimes fecais diarréicos de bezerros naturalmente infectados. Amostras previamente analisadas quanto à presença do BCoV por meio da SN-PCR, foram obtidas de bezerros com até 30 dias de idade com sinais clínicos de diarreia. A monocamada de células foi inoculada com suspensão (10-20% p/v) de amostras fecais em meio Dulbecco, previamente tratado com antibiótico e tripsina (5 µg/mL). As células inoculadas foram mantidas em *roller* a 37°C e examinadas diariamente para a visualização de efeito citopático (ECP). A cada cinco dias era realizada uma nova passagem em células. Tubos contendo monocamada de células não-inoculadas, e inoculadas com estirpe Mebus do BCoV, foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Na terceira passagem em cultura celular duas amostras revelaram ECP característico do BCoV. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, a terceira passagem destas duas amostras revelou títulos hemaglutinantes de 16 e 32 unidades. A SN-PCR amplificou um fragmento com 251 pb do gene que codifica a nucleoproteína do BCoV de duas estirpes selvagens, além da estirpe Mebus. A especificidade dos fragmentos amplificados pela SN-PCR foi avaliada por meio da RFLP com a enzima *Hae* III, por seqüenciamento dos fragmentos amplificados. Ambas as técnicas, RFLP e o seqüenciamento, confirmaram que o fragmento amplificado de 251 pb era específico do BCoV, apresentando 99% e 97% de similaridade entre os isolados e a estirpe Mebus do BCoV, respectivamente. O isolamento de estirpes brasileiras do BCoV é fundamental para a avaliação dos métodos de diagnóstico assim como de medidas de controle, incluindo programas de vacinação, em rebanhos bovinos de corte e leite.

Palavras-chave: bovinos, diarreia neonatal bovina, coronavírus bovino, diagnóstico, isolamento viral.

Brief Report

The bovine coronavirus (BCoV) is a member of the family *Coronaviridae*, order *Nidovirales*, and belongs to antigenic group 2 of the coronaviruses, according to International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). The virus has a single-stranded positive sense RNA genome of 32 kb length, encoding five major structural proteins: the nucleocapsid (N), the transmembrane (M), the hemagglutinin esterase (HE), the spike (S), and the small membrane protein (E). The N protein, a phosphoprotein of 50–60 kDa, interacts with genomic RNA to form the viral nucleocapsid, playing role in BCoV replication (LAI and CAVANAGH, 1997).

In calves BCoV infection may results in neonatal calf diarrhea, an acute enteric disease of beef and dairy cattle herds around the world (HECKERT *et al.*, 1990; GARCIA *et al.*, 2000; MOTHA and HANSEN, 1998; PÉREZ *et al.*, 1998). In Brazil there are few studies relative to BCoV diagnosis. Jerez *et al.* (2002) detected BCoV by HA and HI techniques in 28 (39%) diarrheic fecal samples from dairy cattle herds of São Paulo State. More recently, Takiuchi *et al.* (2006), using the semi-nested PCR (SN-PCR) assay, identified the BCoV RNA in 12 (24%) fecal specimens from calves up to 30 days old in the Brazilian States of Paraná, São Paulo, and Mato Grosso do Sul.

Neonatal diarrhea is the most representative form of the BCoV infection. Nevertheless, the virus causes severe diarrhea in adult cattle, called winter dysentery, and is associated with upper respiratory tract infections (CLARK, 1993).

For the diagnosis of BCoV infection, several diagnostic techniques, such as electron microscopy (EM), hemagglutination (HA) / hemagglutination inhibition (HI) test, and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), have been used (SATO *et al.*, 1977; BULGIN *et al.*, 1989; KAPIL *et al.*, 1999, SCHOENTHALER and KAPIL,

1999). Recently, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) followed by SN-PCR assay for BCoV RNA detection from fecal specimens of naturally infected calves, has been described (TAKIUCHI *et al.*, 2006).

BCoV is difficult to isolate and this technique is rarely used for the diagnosis of neonatal calf diarrhea. Furthermore, virus isolation requires a complex methodology and long time to obtain conclusive results (KAPIL *et al.*, 1996). However, cell culture propagation of BCoV wild-type strain may be useful for further antigenic and molecular characterization, evaluation of biological activities, and pathological studies with biological model (experimental infection). Virus isolation in cell culture may also identify BCoV not detected by ELISA (QUINN *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 1999). In Brazil there is only one description of BCoV isolation; the virus obtained from calves with diarrhea, was succeeded propagated in monolayers of Hamster lung (HmLu-1) cells (JEREZ *et al.*, 2005).

The aim of this study was to report the isolation and molecular characterization of BCoV wild-type strains in human rectal tumor (HRT-18) cells from diarrheic fecal specimens of naturally infected calves.

Three fecal samples (BCVN1, BCVN2 and BCVN3) were obtained from calves up to 30 days old with clinical signs of diarrhea. The fecal specimens were previously confirmed to be BCoV positive by SN-PCR assay, according results of previous study of Takiuchi *et al.*, (2006). The fresh diarrheic fecal samples were prepared as 20% (w/v) suspensions in 0.01M phosphate-buffered saline pH 7.2 (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 15 mM KH₂PO₄), centrifuged at 3000 *g* for 15 min at 4 °C. The supernatants were stored at 4 °C, and used for virus isolation in cell culture.

The HRT-18 cells were grown in a roller system with Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Gibco BRL[®], USA), supplemented with 10% fetal bovine serum

(FBS, Gibco[®] BRL, USA); 55 µg/ml gentamicin (Sigma Co., USA) and 2,5 µg/ml amphotericin B (Bristol-Meyers Squibb Co., Brazil). Confluent monolayers were washed with calcium and magnesium free PBS containing 5 µg/ml trypsin (Sigma Co., USA), and fecal suspension, previously treated with gentamicin and amphotericin B, was then added to the monolayers. The virus was allowed to adsorb at 37 °C for 90 min in roller system. The inoculated HRT-18 cells were kept in a roller drum for 5 days at 37°C.

During 3 to 5 days the monolayers were examined daily for cytopathic effects (CPE). After 5 days from the blind passage, or when approximately 75% of the cells had CPE, 3 freeze-thaw cycles were used to release the BCoV, which was then harvested by pooling the cells and supernatants. After three sequential passages, two isolates (BCVN1 and BCVN2) showed CPE, evident at 2 to 3 days post-inoculation.

The CPE consisted of granular, swollen, or enlarged cells. The membranes of the enlarged cells appeared to be fused and resembled syncytia, which are often observed in HRT-18 cells, inoculated with coronavirus Kakegawa strain. Focal to diffuse cytoplasmic vacuolation was also observed and it was prominent at 4 to 7 days post-inoculation, in agreement with previous reports (BENFIELD and SAIF, 1990). Concomitantly during passages, a non-inoculated HRT-18 cell was used, as negative control to compare the monolayer morphology and rule out artifacts due to natural HRT-18 cells getting old and trypsin effect. A negative SN-PCR of a non-infected control cell, confirmed that the HRT-18 cell used was BCoV free.

For characterization of BCoV isolates, the hemagglutination activity of the wild-type virus was evaluated by HA test, performed using the microtiter method in U-botton plates (BrandTech Scientific Inc., USA). Serial twofold dilutions of non-purified

wild-type BCoV were prepared in 25 µl of 0.01 M PBS, containing 0.1% bovine serum albumin (Sigma Co., USA), and mixed with 25 µl of 1,5% suspension of mouse erythrocytes. After mixture, the plates were incubated at 4°C for two hours. Hemagglutination titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution complete agglutination. The samples isolated in the present study had a hemagglutination titer of 16 and 32 units, per 25 µl of the cell culture suspension.

Kapil *et al.* (1996) isolated BCoV after 1 passage in HRT-18 cells and had a hemagglutination titer of at least 128 units per 25 µl of fecal suspension. The relative low HA titers of our wild-type BCoV strains could be partially related to the frequency of passages in HRT-18 cell. The presence of trypsin in medium could inhibit the ability of BCoV to bind to mouse erythrocytes. Another explanation is that BCoV particles produced in trypsin-treated HRT-18 culture have uniformly shorter surface projections, consequently, influencing the virus hemagglutination activity, being decreased after 2 or 3 passages (STORZ *et al.*, 1981). However, the difference in the hemagglutinating activities of this BCoV Brazilian wild-type strain may be not ruled out, considering that BCoV have been identified by SN-PCR, from HA negatives diarrheic fecal samples (data not-published).

In our laboratory the complete S gene of wild-type BCoV, amplified by RT-PCR directly from fresh fecal samples of naturally infected diarrheic calves, has been sequenced. Preliminary evaluation revealed one amino acid mutation at position 767 (R→ S), in the proteolytic cleavage site, CGT to AGT, of the S protein (TAKIUCHI, 2006). The ability of coronaviruses to bind erythrocytes is due to the S and HE glycoproteins. Previous reports state that the S glycoprotein is more important and involved with the adsorption activities than the HE glycoprotein (FAZAKERLEY *et al.*, 1992).

A RT-PCR followed by a SN-PCR assay was carried out with the suspension of infected HRT-18 cells, confirm the BCoV isolates. The N gene of BCoV was detected in both isolates, revealing amplicons of 251 bp. The specificity of the SN-PCR amplicons were first confirmed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *Hae* III enzyme (Invitrogen™ Life Technologies, USA), yielding fragments of 163 and 88 bp size (Fig. 1). In addition, the SN-PCR amplicons were purified by QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, USA) and submitted to DNA sequencing in MegaBACE 1000/Automated 96 Capillary DNA Sequencer (Amersham Biosciences, UK). The quality of each sequence obtained was analyzed with the Phred/Phrap/Consed software (<http://www.phrap.org/>) and sequence identity was checked with sequences deposited in the GenBank using the BLAST software analysis (Table 1). Both techniques, RFLP and sequencing, confirmed that the 251 bp amplicons were BCoV, presenting, 99% of identity between the isolates and 97% of identity between BCoV Mebus strain (GenBank accession number U00735).

Table 1. Sequence identity matrix between the isolates and Mebus BCoV strain.

Sequences	BCVN1	BCVN2	MEBUS
BCVN1	ID	0.989	0.979
BCVN2	0.989	ID	0.979
MEBUS	0.979	0.979	ID

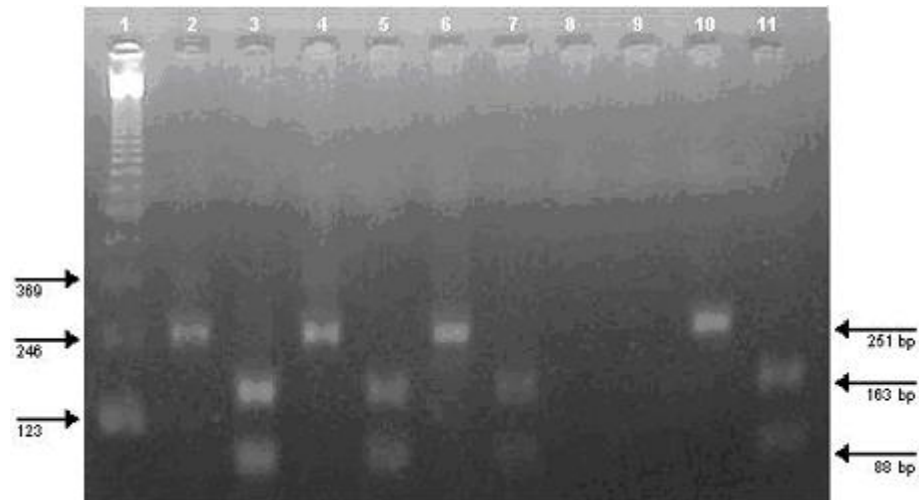


Fig. 1. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) with *Hae* III enzyme of BCoV N gene amplicons. Lane 1: 123 bp ladder (Invitrogen™ Life Technologies, USA); lanes 2, 4, 6 and 10: BCoV N gene SN-PCR amplicons; lanes 3, 5, 7 and 11: RFLP of BCoV N gene SN-PCR amplicons. Lanes 2–7: HRT-18 cell isolates; lanes 10 and 11: BCoV Mebus strain.

In the present study, coronavirus was isolated in cell culture from two out of three diarrheic fecal samples from naturally BCoV infected calves. Isolation of the wild-type BCoV strains was confirmed by similarities of CPE with previous reports (BENFIELD and SAIF, 1990; KAPIL et al., 1996); hemagglutination activity; and detection of the N gene of BCoV in both fresh feces and infected HRT-18 cell.

The success of virus isolation was achieved due to the fact that HRT-18 cells have been permissive for BCoV isolation (BENFIELD and SAIF, 1990). Proteolytic enzyme, as trypsin, used in fecal suspensions before inoculation, also represents an important factor, enhancing the virus infectivity *in vitro* and isolation of BCoV by activation of cell fusion activity (STORZ et al., 1981).

In this study the cell culture isolation of BCoV wild-type strain was successfully achieved from fresh diarrheic feces of naturally infected calves. Ours results differs

from other reports (BENFIELD and SAIF, 1990), where previous virus amplification has been performed in biological model, using susceptible calves inoculated with feces from sick animals.

It's well established that primary isolation of BCoV in cell culture is difficult, especially under a routine virology diagnosis (KAPIL et al., 1996). Nevertheless it is useful to obtain BCoV wild-type strain for virological, antigenic and molecular studies. This Brazilian wild-type BCoV isolated may represent a source for pathological studies *in vivo* using biological models, such as experimental infection, as well as for other *in vitro* virological studies. The hemagglutinating activities of this wild-type BCoV strains needs more investigation and may represent a substantial begin for further studies considering differences in biological properties.

References:

- BENFIELD, D.A. and SAIF, L.J. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.1454-1457, 1990.
- BULGIN, M.S., WARD, A.C.S., BARRET, D.P., LANE, V.M. Detection of rotavirus and coronavirus shedding in two beef cow herds in Idaho. **Can. Vet. J.**, v.30, p.235-239, 1989.
- CLARK, M.A. Bovine coronavirus. **Br. Vet. J.**, v.149, p.51-70, 1993.
- FAZAKERLEY, J.K.; PARKER, S.E.; BLOOM, F.; BUCHMEIER, M.J. The V5A13.1 envelope glycoprotein deletion mutant of mouse hepatitis virus type-4 is neuroattenuated by its reduced rate of spread in the central nervous system. **Virology**, v. 187, p. 178-188, 1992.
- GARCIA, A.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; ORDEN, J.A.; CID, D.; SANZ, R.; GOMEZ-BAUTISTA, M.; DE LA FUENTE, R. Rotavirus and current infections with other enteropathogens in neonatal diarrheic dairy calves in Spain. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, p.175-183, 2000.
- HECKERT, R.A.; SAIF, L.J.; HOBLET, K.H.; AGNES, A.G. A longitudinal study of bovine coronavirus enteric and respiratory infections in dairy calves in two herds of Ohio. **Vet. Microbiol.**, v.22, p.187-201, 1990.

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

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

KAPIL, S., RICHARDSON, K.L., MAAG, T.R., GOYALI, S.M. Characterization of bovine coronavirus isolates from eight different states in the USA. **Vet. Microbiol.**, v.67, p.221–230, 1999.

KAPIL, S., RICHARDSON, K.L., RADI, C., CHARD-BERGSTROM, C. Factors affecting isolation and propagation of bovine coronavirus in human rectal tumor-18 cell line. **J. Vet. Diagn. Invest.**, V.8, p.96–99. 1996.

LAI, M.M.C. and CAVANAGH, D. The molecular biology of coronaviruses. **Adv. Virus Res.**, v.48, p.1–100, 1997.

MOTHA, M.X.J. and HANSEN, M.F. Prevalence of IBR, PI 3, BRS and BCV infections in the dairy cattle population of New Zealand. **New Zeal. Vet. J.**, v.46, p.239-240, 1998.

PÉREZ, E.; KUMMELING, A.; JANSSEN, M.M.H.; JIMENEZ, C.; ALVARADO, R.; CABALLERO, M.; DONADO, P.; DWINGER, R.H. Infectious agents associated with diarrhea of calves in the canton of Tilarán, Costa Rica. **Prev. Vet. Med.**, v.33, p.195-205, 1998.

QUINN, P.J.; MARLEY, B.K.; CARTER, M.E. Laboratory Diagnosis of viral infections In: QUINN, P.J.; MARLEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. Oxford: Blackwell Science Ltd, p. 305-312, 2004.

SATO, K., INABA, Y., KUROGI, H., TAKAHASHI, E., SATODA, K., OMORI, T., MATSUMOTO, M. Hemagglutination by calf diarrhea coronavirus. **Vet. Microbiol.**, v.2, p.83–87, 1977.

SCHOENTHALER, S.L. and KAPIL, S. Development and applications of a bovine coronavirus antigen detection enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v.6, p.130–132, 1999.

SILVA, M.R., O'REILLY, K.L., LIN, X., STINE, L., STORZ, J. Sensitivity comparison for detection of respiratory bovine coronaviruses in nasal samples from feedlot cattle by ELISA and isolation with the G clone of HRT-18 cells. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.11, p.15–19, 1999.

STORZ, J.; ROTT, R.; KALUZA, G. Enhancement of plaque formation and cell fusion of an enteropathogenic coronavirus by trypsin treatment. **Infect. Immun.**, v.31, p.1214–1222, 1981.

TAKIUCHI, E. **Diagnóstico molecular e análise de polimorfismos do gene S1 de estirpes brasileiras do coronavírus bovino em fezes diarreicas de bezerros naturalmente infectados**. Tese de Doutorado apresentada à Universidade estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil, p. 108, 2006.

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. **J. Virol. Meth.**, v.131, p.148-154, 2006.

4 CONCLUSÕES

4 CONCLUSÕES

- A taxa de detecção (15,6%) do BCoV, por meio da SN-PCR, em uma coleção de fezes de bezerros ($n=282$) provenientes de quatro estados (PR, SP, MT, MG) caracteriza a presença desse vírus nos rebanhos bovinos brasileiros;
- A detecção do BCoV em 19% ($P<0,05$) das amostras de fezes diarréicas avaliadas demonstra que esse vírus é um importante enteropatógeno neonatal para o rebanho bovino brasileiro;
- O BCoV pode ser encontrado em fezes diarréicas de bezerros do nascimento até os 60 dias de idade, porém a infecção é mais prevalente ($P<0,05$) em animais na faixa etária de 3 e 4 semanas;
- O uso em conjunto de técnicas de virologia clássica, como o isolamento viral em cultivo celular, e de virologia molecular, como a SN-PCR e o seqüenciamento, foi preponderante para o sucesso no isolamento e identificação de duas estirpes selvagens brasileiras do BCoV a partir de amostras de fezes de bezerros com quadro clínico de diarréia.

APÊNDICE A: Lista de Reagentes

1. Solução 100 mM dNTP, 4 x 250 µL; 25 µmol cada (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies™)
2. 10 x PCR-buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies™)
3. 123 bp DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies™)
4. 2-Mercapto-ethanol (C₂H₆O₅) P.M. 78,13 (Fluka™)
5. 5 x RT-Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies™)
6. Acetona, P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
7. Ácido acético glacial, P.A. (CH₃COOH) P.M. 60,05 (Nuclear®)
8. Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Reagen®)
9. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
10. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
11. Agarose (Gibco® BRL)
12. Álcool etílico absoluto (C₂H₂OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
13. Álcool isoamílico (CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)
14. Azul de bromofenol (Sigma™)
15. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO₃) P.M. 84,01 (Biotec™)
16. Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma™)
17. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
18. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
19. Clorofórmio, P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
20. Dihiotreitol – DTT (Invitrogen Life Technologies™)
21. Dodecilsulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (Synth®)
22. Dulbecco's Modified Eagle Media 17.7g/pkg (Gibco® BRL)
23. Soro fetal bovino - FBS (Gibco® BRL)
24. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na₂HPO₄) P.M. 141,96 (Synth®)
25. Fosfato de sódio monobásico (NaH₂PO₄ H₂O) P.M. 137,99 (Reagen®)

26. Fungizon® Anfotericina B (Bristol-Meyers Squibb® Brasil)
27. Gentamicin Reagent Solution (10 mg/mL), líquida (Sigma™)
28. Glicina, P.A. (Nuclear®)
29. Glicose (Reagen®)
30. Isoticianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco® BRL)
31. Filtro MF 0,22 µm 47mm 100/CX (Millipore®)
32. *Hae* III (5'- GG↓CC -3', 3'- CC↑GG - 5') 2500 unidades; 10 U/µL (Invitrogen Life Technologies™)
33. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,0 (Dinâmica™)
34. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,1 (Inlab®)
35. Membrana em éster de celulose, 0,22 µm de poro, 47 mm (Millipore®)
36. Metanol, P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (Alkimia®)
37. M-MLV Reverse Transcriptase - 200 units/µL (Invitrogen Life Technologies™)
38. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 unidades (Invitrogen Life Technologies™)
39. REACT® 2 (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl) (Invitrogen Life Technologies™)
40. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,3 (Reagen®)
41. Dióxido de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma™)
42. Enzima TripLE™ Express Stable Trypsin-like (Gibco® BRL)

APÊNDICE B: Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica**
 - 60 g de sílica
 - Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Adicionar 600 μ L de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
 - Aliquotar e autoclavar

- **Solução L6**
 - 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 g de Triton x 100

- **Solução L2**
 - 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de Amostra**
 - Azul de bromofenol 0,25%
 - Sacarose – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%

- **Tampão de eletroforese: TBE (TRIS – Ácido bórico – EDTA) 10 x []**
 - 0,89 M TRIS
 - 0,89 M ácido bórico
 - 0,02 M EDTA dissodium
 - Água bidestilada q.s.p. 1 L
 - pH = 8,4

- **Tampão estabilizador de rotavírus (TRIS/Ca⁺⁺ 10 x)**
 - 12,12 g TRIS (10 mM)
 - 2,2 g cloreto de cálcio (1,5 mM)
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 L
 - pH = 7,4

- **Tampão fosfato salina (PBS)**
 - 137 mM cloreto de sódio (NaCl)
 - 3 mM cloreto de potássio (KCl)
 - 8 mM fosfato sódio dibásico (Na₂HPO₄)
 - 15 mM fosfato potássio monobásico (K₂H₂PO₄)
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 L
 - pH = 7,2

- **SDS 10%**
 - 5 g dodecilsulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 mL

- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (24:24:1)**
 - 24 mL fenol saturado
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico

- **Tripsina Verseno 10x**
 - 40 g cloreto de sódio (NaCl)
 - 2 g cloreto de potássio (KCl)
 - 5 g glicose
 - 2.9 g carbonato de sódio
 - 1 g EDTA
 - 2.5 g Tripsina (1:250)
 - 2 mL vermelho de fenol
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 500 mL

- **Tripsina (Uso)**

- 100 mL Água MilliQ autoclavada
- 10 mL solução Tripsina Verseno 10x

- **Salina St. Groth**

- 8 g cloreto de sódio (NaCl)
- 0,4 g cloreto de potássio (KCl)
- 1.77 g fosfato de sódio dibásico anidro ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 0,69 g fosfato de sódio monobásico anidro ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- 2 g glicose
- Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 L
- pH 7.2

- **Meio de cultura**

- 100 mL Dulbecco Media
- 10 mL soro fetal bovino
- 1 mL aminoácido não essencial
- 1 mL glutamina
- 55 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anfotericina B
- 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicina
- pH 7.2

APÊNDICE C: Protocolo de Técnicas

- **Suspensão fecal – Extração bruta**
 - 1g do extrato fecal
 - 9 ml de tampão TRIS/Ca⁺⁺ 1X
(Para amostras muito líquidas estabelecer proporção 1:2)
 - Homogeneizar
 - Centrifugar 10 min a 10.000 x g
 - Recolher sobrenadante
 - Identificar e estocar em frascos a 4° C

- **Extração do RNA: associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/ isotiocianato de guanidina**
 - 400 µL da suspensão fecal
 - 400 µL de fenol / clorofórmio – álcool isoamílico
 - Homogeneizar em vórtex
 - Banho-maria a 56° C durante 15 min.
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 10 min.
 - Recolher sobrenadante em outro tubo
 - 30 µL de sílica hidratada
 - 900 µL de solução L6
 - Homogeneizar em vórtex
 - Agitar durante 30 min. à temperatura ambiente
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 500 µL de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 500 µL de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M

- Adicionar 1 mL de etanol a 70%
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante
 - Adicionar 1 mL de etanol a 70%
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante
 - Adicionar 1 mL de acetona PA
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 g durante 1 min.
 - Desprezar sobrenadante
 - Secar o *pellet* em banho-maria à 56° C durante 15 min. (tubo aberto)
 - Adicionar 50 µL de água MilliQ autoclavada
 - Homogeneizar em vórtex
 - Banho-maria à 56° C durante 15 min. (tubo fechado)
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 2 min.
 - Recolher sobrenadante em eppendorf de 500 µL
 - Estocar a -20°C
- **Desnaturação**
 - 5 µL RNA extraído
 - 1µL *primer* BCV1 forward (5'-CGATGAGGCTATTCCGAC-3')
 - 4 µL água MilliQ autoclavada
 - 4 min. a 97°C
 - 5 min. banho-de-gelo
- **RT-PCR**
 - 5 µL RNA extraído
 - 10 µL RT-MIX
 - 30 min. a 42°C
 - 5 min. a 95°C
 - manter a 4°

- **PCR**

Um volume de 8 μL do produto da RT (cDNA), é adicionado a 42 μL do PCR *mix* composto por 1,5 x PCR buffer; 2 mM MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; 20 pmol de cada *primer* [BCV1 (5'-CGATGAGGCTATTCCGAC-3') e BCV2 (5'-TGTGGGTGCGAGTTCTGC-3')]; 2,5 unidades de enzima *Platinum Taq* DNA *polymerase*, e água esterilizada ultrapura para um volume final de 50 μL . Em termociclador, as amostras são incubadas a 94°C por 2 minutos inicialmente e, em seguida, submetidas a 40 ciclos em temperatura de 94°C por 1 minuto, para a desnaturação; 55°C por 1 minuto, para o anelamento ou hibridização dos *primers*; e extensão a 72°C por 1 minuto. Por fim, as amostras são submetidas à extensão final à 72°C por 7 minutos e mantidas a 4 °C até a próxima etapa de amplificação.

- **SN-PCR**

Um volume de 3 μL do produto amplificado pela PCR, é adicionado a 47 μL do SN-PCR *mix* composto por 1 x PCR buffer; 2 mM MgCl_2 ; 0,2 mM de cada dNTP; 20 pmol de cada *primer* [BCV3 (5'-TTGCTAGTCTTGTCTGGC-3') e BCV2 (5'-TGTGGGTGCGAGTTCTGC-3')]; 2,5 unidades de enzima *Platinum Taq* DNA *polymerase*, e água esterilizada ultrapura para um volume final de 50 μL . Em termociclador, as amostras são incubadas a 94°C por 2 minutos inicialmente e, em seguida, submetidas a 30 ciclos em temperatura de 94°C por 1 minuto, para a desnaturação; 55°C por 1 minuto, para o anelamento ou hibridização dos *primers*; e extensão a 72°C por 1 minuto. Por fim, as amostras são submetidas à extensão final a 72°C por 7 minutos e mantidas a 4 °C.

- **Digestão enzimática dos produtos de PCR – *Hae* III**

- 1 μL (10U) da enzima de restrição (*Hae* III)
- 2 μL do tampão da enzima (REACT[®]2)
- 3 μL de água ultrapura estéril
- 15 μL do produto da PCR
- Incubar a 37°C por 1 a 2 h.

- **Gel de agarose a 2%**

- 1 g de agarose
- 50 mL TEB 1 x
- 30 μL brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)