

PAULO EDUARDO BRANDÃO

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

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Jerez

São Paulo

2004

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

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



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


Comissão Bioética

CERTIFICADO

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

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

São Paulo, 27 de fevereiro de 2002


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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRANDÃO, P. E.

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

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

Data: 13/02/2004

Banca Examinadora

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

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

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

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

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

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

dedico.

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos funcionários do VPS

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

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

À FAPESP

RESUMO

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

