



DETECÇÃO DO CORONAVÍRUS BOVINO EM BEZERROS COM DOENÇA RESPIRATÓRIA NO MUNICÍPIO DE OURO VERDE DO OESTE -PARANÁ

Mello, J. L.¹; Lorencena, D.¹; Delai, R. R.¹; Kunz, A. F.¹; **Possati, F.²**; Takiuchi, E.^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, Palotina, Paraná, Brasil.

²Laboratório de Virologia Animal – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

*e-mail: elisabete.takiuchi@gmail.com

Área de conhecimento: Saúde única - Microbiologia

Palavras-chave: coronavírus bovino, doença respiratória, secreção nasal.

Introdução

O coronavírus bovino (BCoV) é um RNA vírus pertencente à ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, gênero *Betacoronavirus* 1. Devido ao seu tropismo pelo trato respiratório e intestinal, o BCoV tem sido frequentemente associado com episódios de diarreia em bezerros, disenteria em animais adultos (*winter dysentery*) e doença respiratória (BOILEAU E KAPIL, 2010). Embora no Brasil sejam relatados vários estudos do BCoV entérico, ainda é inexistente a detecção de BCoV em casos de doenças respiratória em rebanhos bovinos (STIPP *et al.*, 2009; BRANDÃO *et al.*, 2002; TAKIUCHI *et al.*, 2009). Devido à semelhança dos sinais clínicos com outros agentes do complexo respiratório bovino é essencial a utilização de uma metodologia específica para o diagnóstico conclusivo da infecção pelo BCoV. A RT-PCR, além de ser altamente específica, permite a detecção de baixos títulos virais na amostra biológica. O objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência do BCoV em secreções nasais de bezerros provenientes de rebanhos com problemas respiratórios utilizando a técnica RT-PCR.

Material e métodos

Foram investigados três rebanhos bovinos de aptidão leiteira com problemas respiratórios, localizados no município Ouro Verde do Oeste, no estado do Paraná. A amostragem ($n=33$) incluiu secreções nasais de animais com sinais respiratórios (secreção nasal acentuada, dispnéia ou tosse) ($n=12$) e animais assintomáticos ($n=21$).

As secreções nasais foram coletadas por fricção de suabe estéril nas duas fossas nasais de cada animal, acondicionadas em tubos cônicos contendo 2 mL de PBS pH



7,2 e mantidas refrigeradas até o momento do processamento. Alíquotas de 450 μ L das amostras em suspensão foram submetidas à extração do ácido nucleico pela associação das técnicas fenol clorofórmio – álcool isoamílico associada à sílica-isotiocianato de guanidina. A técnica de *Semi-nested* PCR para a amplificação parcial do gene N do BCoV foi utilizada de acordo com metodologia descrita por Alfieri *et al.* (2016), com tamanhos esperados de 454 pb e 251 pb no primeiro e segundo *round* de amplificação, respectivamente. Para validação do teste foram incluídos em todos os procedimentos de extração e amplificação, um controle negativo (água ultrapura autoclavada) e um controle positivo (cepa Kakegawa-BCoV isolada em cultura de células HRT-18).

Resultados e Discussão

O BCoV estava presente em dois dos três rebanhos avaliados, com 42,4% (14/33) dos animais amostrados positivos. Destes, 10 encontravam-se assintomáticos no momento da coleta. A presença do BCoV em animais assintomáticos pode indicar animais na fase precoce da doença. Na propriedade 1, o BCoV foi detectado em todos os animais amostrados ($n=11$), entre os quais oito foram positivos já no primeiro *round* de amplificação (*amplicon* de 454 pb), evidenciando a alta excreção viral (Figura 1).

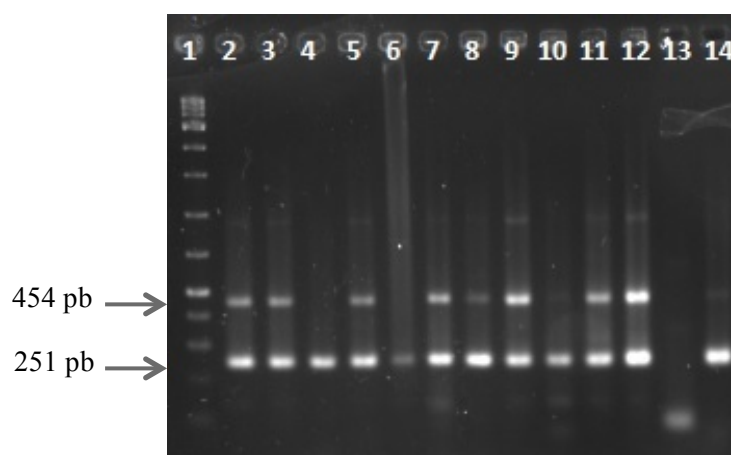


Figura 1: Detecção do BCoV em secreções nasais por *Semi-nested* PCR. Setas indicam o tamanho molecular dos fragmentos no primeiro *round* (454 bp) e segundo *round* (251 bp) de amplificação. Linha 1: Marcador de tamanho molecular 100 bp. Linhas 2 a 12: secreções nasais de bezerros da propriedade 1; Linha 13: controle negativo; Linha 14: Controle positivo (amostra Kakegawa BCoV).

Diversos estudos em diferentes países já atribuíram ao BCoV a etiologia de doença respiratória (CHO *et al.*, 2001; DECARO *et al.*, 2008). Este trabalho, no



entanto, é o primeiro relato de detecção do BCoV em secreções nasais de rebanhos bovinos brasileiros com problemas respiratórios.

Conclusões

Os resultados demonstram a circulação do BCoV em rebanhos bovinos no Paraná com problemas respiratórios e a aplicabilidade da técnica *Semi-nested* PCR para o diagnóstico conclusivo.

Suporte financeiro

CAPES, PRPPG-UFPR

Referências

ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F.; TAKIUCHI, E. Detection of Bovine Coronavirus by Conventional Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction. **Animal Coronaviruses - Springer Protocols Handbooks**, Leyi Wang, p.101-103, 2016, cap. 9.

BOILEAU, M.J.; KAPIL, S. Bovine Coronavirus Associated Syndromes. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**. v. 26, p. 123–146, 2010.

BRANDÃO, P.E.; BIRGEL JR, E.H.; GREGORI, F.; ROSALES, C.A.R.; RUIZ, V.L.A.; JEREZ, J.A. Bovine Coronavirus Detection in Adult Cows in Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.69, n.2, p.103-104, 2002.

CHO, K.O.; HOET, A.E.; LOERCH, S.C. Evaluation of concurrent shedding of bovine coronavirus via the respiratory tract and enteric route in feedlot cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p.1436–1441, 2001.

DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; CIRONE, F.; D'ABRAMO, M.; LORUSSO, E.; GRECO, G.; MARI, V.; COLAIANNI, M.L.; ELLIA, G.; MARTELLA, V.; BUONAVOGLIA, C. Respiratory disease associated with bovine coronavirus infection in cattle herds in Southern Italy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.20 p.28–32, 2008.

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

TAKIUCHI, E.; BARRY, A.F.; ALFIERI, A.F.; FILIPPSEN, P.; ALFIERI, A.A.; An Outbreak of Winter Dysentery Caused by Bovine Coronavirus in a High-Production Dairy Cattle Herd from a Tropical Country. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, p.57-61, 2009.