

## **APLICAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOSHISTOQUÍMICA DIRETA (IHQ) NA DETECÇÃO DA PRESENÇA DO CORONAVÍRUS EM TECIDOS DE PERUS ACOMETIDOS DE PEMS.**

Paloma de Oliveira Tonietti, Thaís Larissa Lourenço Castanheira, Tereza Cristina Cardoso, Analy Ramos Mendes. – Microbiologia - Curso de Medicina Veterinária - Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Laboratório de Virologia – Campus Araçatuba.

O Complexo de Enterite de Perus (PEC) tem sido incriminado como uma das maiores causas de perdas econômicas nos países como Canadá, USA e Reino Unido. O Brasil hoje assume o terceiro maior produtor de carne de perus e derivados no âmbito mundial (AviSite, 2006). O coronavírus dos perus (TCoV – Turkey Coronavírus) ocasiona uma doença entérica aguda e altamente contagiosa nas aves, inicialmente denominada de “doença da crista azul”, e esta foi primeiramente identificada em perus em 1951 (Breslin et al., 2001). Após esforços para identificar a etiologia da “doença da crista azul”, em 1973, o coronavírus, foi incriminado como o agente etiológico (Guy, 2003). As grandes perdas econômicas resultantes da infecção pelo TCoV ocorrem por prejudicar o crescimento e a conversão alimentar em virtude de quadros de diarreia (Calibeo-Hayes et al., 2003; Guy et al., 2002; Guy, 2003; Ismail et al., 2003), além dos gastos com medicamentos (Cavanagh, 2005b).

O TCoV pertence ao grupo 3 dos coronavírus, o qual também engloba o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) e o coronavírus dos faisões (PhCoV). Um quarto grupo surgiu após a identificação do SARS-CoV pelo World Health Organization em abril de 2003. Esse vírus tem a habilidade de infectar humanos e produzir doença clínica denominada Síndrome Aguda Respiratória Severa (Marra et al., 2003). As partículas virais do coronavírus são envelopadas e possuem uma fita de RNA simples, não segmentada com sentido positivo. A principal proteína estrutural do envelope é a proteína S. Esta confere a aparência espiculada do virion, e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes, sendo a subunidade S1 a que contém a maior parte de sítios antigênicos. (Cavanagh, 2005a)., e neste estudo, foi realizada a detecção de coronavírus (TCoV) em perus afetados com 30-120 dias de idade de uma determinada região produtora no Brasil.

Baseado nas técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase, o TCoV realiza sua replicação primária, primariamente nos enterócitos do jejuno e íleo, e no epitélio folicular e interfolicular da bursa de Fabricius. Em embriões inoculados, a replicação ocorre exclusivamente nas células do epitélio intestinal e epitélio da bursa de Fabricius. As lesões macroscópicas incluem duodeno e jejuno pálidos e flácidos, ceco distendido e com conteúdo aquoso, além de atrofia, emaciação e desidratação de bursa. As lesões microscópicas englobam encurtamento das vilosidades intestinais, aprofundamento das criptas, diminuição do diâmetro intestinal, separação da lâmina própria dos enterócitos e sua infiltração por heterófilos e linfócitos, e ainda, necrose, hiperplasia e intensa inflamação heterofílica da bursa de Fabricius. O TCoV tem se mostrado permanecer viável em tecidos intestinais armazenados a – 20°C ou menos, por mais de 5 anos (Guy, 2003).

A enterite por TCoV afeta perus de todas as idades e tem período de incubação de 1 a 5 dias (Ismail et al., 2003; Sellers et al., 2004), com mortalidade podendo chegar a 100% (Dalton et al., 2002; Heggen et al., 1998; Loa et al., 2000; Sellers et al., 2004). O vírus também tem sido associado como um dos agentes causais da “Síndrome da Enterite e Mortalidade dos Perus” (PEMs), uma doença caracterizada por alta mortalidade, severo déficit no crescimento e imunodisfunção (Calibeo-Hayes et al., 2003; Cavanagh et al., 2005b; Guy, 2003; Ismail et al., 2003), resultado da atrofia dos órgãos linfóides (Heggen et al., 1998). A etiologia da PEMs ainda é desconhecida. Mas, muito agentes virais, incluindo o *Coronavirus*, têm sido identificados em perus com PEMs (Guy, 2003; Heggen et al., 1998; Spackman et al., 2004). Segundo Ismail et al. (2003), a PEMs afeta principalmente perus com idade entre 1 a 4 semanas. Os TCoV são eliminados nas fezes de aves infectadas, com transmissão horizontal, a partir de ingestão de fezes contaminadas e de materiais contaminados com fezes, respectivamente (Guy, 2003).

Não existe vacinação para TCoV (Cavanagh, 2005b; Sellers et al., 2004), sendo o controle da enfermidade muito importante, uma vez que o tratamento da doença geralmente não obtém sucesso (Loa et al., 2006). O *Coronavirus* bovino (BCoV), em infecções experimentais, foi capaz de causar doença em perus (Ismail et al., 2001), portanto deve-se obter medidas de segurança quando houver tráfego entre duas espécies. No que tange ao isolamento, o TCoV propaga-se com sucesso em ovos

embrionados de galinhas e perus, quando inoculados na cavidade amniótica (Guy, 2003; Ismail et al., 2003). Além do isolamento viral, os meios diagnósticos mais frequentes utilizados para detectar infecção por TCoV são a imunofluorescência direta em cortes de congelação, a imunoperoxidase, microscopia eletrônica, ELISA de captura e a reação de PCR (Spackman et al., 2004). Neste sentido, no presente estudo, decidimos empreender o desenvolvimento e aplicação da reação de imunohistoquímica direta em cortes histológicos de animais com quadros agudos de enterite, enquadrados na síndrome de enterite e mortalidade dos perus no Brasil.

Os cortes contendo 4µm foram submetidos ao processo de desparafinização com xilol e re-hidratação com seqüências de álcool e aquecidos no tampão citrato (pH 6.0) por 15 minutos para ativação antigênica, visto que o antígeno normalmente é danificado durante o processo de fixação com formol. Em seguida, a peroxidase endógena, comumente encontrada em reações inflamatórias, foi bloqueada com banhos de 1 hora de peróxido de hidrogênio e, por fim as reações inespecíficas foram bloqueadas com uma solução 15% de leite em pó desnatado por 1 h. O anticorpo IgG de galinha acoplado a biotina produzido contra o IBV foi utilizado na detecção dos antígenos virais. A diluição ótima foi de 1:200 diluída em solução de 10% de leite em pó desnatado em solução tamponada de fosfato (PBS). Após a adição do anticorpo, os cortes foram incubados durante 18h a 4°C em câmara úmida. Para a revelação foi adicionado o complexo ABC da peroxidase aos cortes. Estes foram incubados por 1 hora a 37°C e, em seguida, foram submetidos a um banho de 30 minutos em temperatura ambiente em uma solução contendo peróxido de hidrogênio 0,02% e diaminobenzidina. A reação foi inibida através de lavagem em água corrente e, por fim, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Meyer.

Os cortes considerados positivos foram aqueles que apresentaram coloração marrom no citoplasma. Os controles negativos foram aqueles em que o anticorpo foi substituído por PBS e ocorreu ausência de reações inespecíficas. Essa metodologia apresentou bons resultados e pode ser empregada para o diagnóstico do TCoV em materiais suspeitos, provenientes do campo, podendo, dessa forma, colaborar para que sejam tomadas medidas adequadas de biossegurança no controle e profilaxia da doença.

## Referências

- AVISITE Ciência & Tecnologia: Produção industrial de perus: características e exigências. Disponível na web <http://www.avesite.com.br/cet/5/13/index.shtm> - acesso em 26/06/2006
- BRESLIN, J. J.; SMITH, L. G.; BARNES, H. J.; GUY, J. S. Comparison of Virus Isolation, Immunohistochemistry, and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Procedures for Detection of Turkey Coronavirus. *Avian Diseases*, v. 44, p. 624-631, 2001.
- CALIBEO-HAYES, D.; DENNING, S. S.; STRINGHAM, S. M.; GUY, J. S.; SMITH, L. G.; WATSON, D. W. Mechanical Transmission of Turkey Coronavirus by Domestic Houseflies (*Musca domestica* Linnaeus). *Avian Diseases*, v. 47, p. 149-153, 2003.
- GUY, J. S.; SMITH, L. G.; BRESLIN, J. J.; PAKPINYO, S. Development of a Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detection of a Turkey Coronavirus Antibodies. *Avian Diseases*, v. 46, p. 334-341, 2002.
- GUY, J. S. Turkey Coronavirus Enteritis. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADRLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Diseases of Poultry**. Iowa State Press, 2003. p. 300-306.
- ISMAIL, M. M.; TANG, Y.; SAIF, Y. M. Pathogenicity of Turkey Coronavirus in Turkeys and Chickens. *Avian Diseases*, v. 47, p. 515-522, 2003.
- CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, v. 34, n. 6, p. 439-448, 2005a.
- CAVANAGH, D. The role of coronaviruses in enteric diseases of turkeys. In: PROCEEDINGS OF THE 24<sup>th</sup> TECHNICAL TURKEYS CONFERENCE, p. 31, 2005b.
- HEGGEN, C. L.; QURESHI, M. A.; EDENS, F. W.; BARNES, H. J.; HAVENSTEIN, G. B. Alterations in the Lymphocytic and Mononuclear Phagocytic Systems of Turkey Polts Enteritis and Mortality Syndrome. *Avian Diseases*, v. 42, p. 711-720, 1998.

SELLERS, H.; KOCI, M. D.; LINNEMANN, E.; KELLEY, L. A.; SHULTZ-CHERRY, S. Development of a Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test Specific for Turkey Astrovirus and Coronavirus. **Avian Diseases**, v. 48, p. 531-539, 2004.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; THACKER, H. L.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Detection of antibody to Turkey Coronavirus by Antibody-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Utilizing Infectious Bronchitis Virus Antigen. **Avian Diseases**, v. 44, p. 498-506, 2000.

MARRA, M. A.; JONES, S. J. M.; ASTELL, C. R.; HOLT, R. A.; WILSON, A. B.; BUTTERFIELD, Y. S. N.; KHATTRA, J.; ASANO, J. K.; BARBER, S.A.; CHAN, S. Y.; CLOUTIER, A.; COUGHLIN, S. M.; FREEMAN, D.; GIRN, N.; GRIFFITH, O. L.; LEACH, S. R.; MAYO, M.; McDONALD, H.; MONTGOMERY, S. B.; PANDOH, P. K.; PETRUSCU, A. S.; ROBERTSON, S. G.; SCHEIN, J. E.; SIDDIQUI, A.; SMAILUS, D. E.; STOTT, J. M.; YANG, G. S.; PLUMMER, F.; ANDONOV, A.; ARTSOB, H.; BASTIEN, N.; BERNARD, K.; BOOTH, T. F.; BOWNESS, D.; BREBOT, M.; FERNANDO, L.; FLICK, R.; GARBUTT, M.; GRAY, M.; GROLLA, A.; JONES, S.; FELDMANN, H.; MEYERS, A.; KABANI, A.; LI, Y.; NORMAND, S.; STROHER, U.; TIPPLES, G. A.; TYLER, S.; VOGRIG, R.; WARD, D.; WATSON, B.; BRUNHAM, R. C.; KRAJDEN, M.; PETRIC, M.; SKOWRONSKI, D. M.; UPTON, C.; ROPER, R. L. The Genome Sequence of the SARS-Associated Coronavirus. Research Article – Scienceexpress [www.sciencexpress.org/1May2003/Page1/10.1126/science.1085953](http://www.sciencexpress.org/1May2003/Page1/10.1126/science.1085953).

DALTON, J. R. F.; NIBLETT, J.; THRUSFIELD, M. V. Response of pheasants to live attenuated turkeys rhinotracheitis vaccine, **Veterinary Record**, v. 151, p. 341-344, 2002.

ISMAIL, M. M.; CHO, K. O.; HASOKSUZ, M.; SAIF, L. J.; SAIF, Y. M. Antigenic and genomic relatedness of turkey-origin coronaviruses, bovine coronaviruses, and infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Diseases**, v. 45, n. 4, p. 978-984, 2001a.

ISMAIL, M. M.; CHO, K. O.; WARD, L. A.; SAIF, Y. M. Experimental bovine coronavirus in turkey poults and young chickens. **Avian Diseases**, v. 45, p. 157-163, 2001b.

SPACKMAN, E.; KAPCZYNSKI, D.; SELLERS, H. Multiplex real – Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Detection of Three Viruses Associated with Poult Enteritis Complex: Turkey Astrovirus, Turkey Coronavirus, and Turkey Reovirus. **Avian Diseases**, v. 49, p. 86-91, 2005.

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

**Bolsa:** FAPESP Processo número: 06/51373-8

**Orientadora:** Prof. Dra. Tereza Cristina Cardoso

**Orientada:** Paloma de Oliveira Tonietti