

APLICAÇÃO DO DOT-ELISA NA DETECÇÃO DIRETA DO TCoV EM MATERIAIS FECAIS DE PERUS ACOMETIDOS DE ENTERITE SEVERA.

Thaís Larissa Lourenço Castanheira, Tereza Cristina Cardoso, Paloma de Oliveira Tonietti, Anely Ramos Mendes. - Microbiologia – Curso de Medicina Veterinária - Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – Laboratório de Virologia - Campus de 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 e exportador de carne de perus e derivados no âmbito mundial, sendo responsável por 5,1% da produção mundial, estando atrás apenas dos Estados Unidos e União Européia (AviSite,2006).

O coronavírus dos perus (TCoV- Turkey Coronavirus) ocasiona uma doença entérica aguda e altamente contagiosa nas aves acarretando quadros de diarreia, resultando em grandes perdas econômicas por prejudicar o crescimento e conversão alimentar das aves, diminuindo a produção de carnes e ovos, além dos gastos com medicamentos (Calibeo-Hayes et al., 2003; Guy et al., 2002; Guy, 2003; Ismail et al., 2003). O TCoV pertence ao grupo 3 dos Coronavírus juntamente com o Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) e Coronavírus dos Faisões (PhCoV).

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 morbidade podendo chegar a 100% (Dalton et al., 2002; Heggen et al., 1998; Loa et al., 2000; Sellers et al., 2004) e a mortalidade pode estar associada a aves jovens, variando entre <10 a 50% ou mais (Cavanagh, 2005a; Heggen et al., 1998; Sellers et al., 2005) e em aves adultas ela é debilitante (Cavanagh, 2005b). Os perus com enterite por coronavírus apresentam depressão, anorexia, hipotermia, desidratação, perda de peso e secreção nasal (Cavanagh, 2005b; Guy, 2003).

Os TCOVs são eliminados nas fezes de aves infectadas, a partir de ingestão de fezes; e com transmissão horizontal a partir de materiais contaminados com fezes. O TCoV é transmitido rapidamente no plantel ou de um plantel a outro. Os principais vetores mecânicos do vírus são o homem, equipamentos, veículos, assim como aves selvagens, roedores, cães e insetos (Guy, 2003).

O TCoV é estável em pH 3 a 22°C por 30 minutos e resistentes a 50°C por uma hora, até mesmo na presença de 1M de sulfato de magnésio. O vírus é inativado com clorofórmio a 4°C por 10 minutos. O TCoV tem se mostrado permanecer viável em tecidos intestinais armazenados a -20°C ou menos, por mais de 5 anos. Cresol e formaldeído são eficientes para eliminar TCoV de ambientes contaminados (Guy, 2003).

O vírus tem sido associado como uma dos agentes causais da “Síndrome da Enterite e Mortalidade dos Perus” (PEMS- Poults Enteritis and Mortality Syndrome), uma doença caracterizada por alta mortalidade, severo déficit no crescimento e imunodisfunção (Calibeo-Hayes et al., 2003; Cavanagh et al., 2005a; Guy, 2003; Ismail et al., 2003), resultando na atrofia dos órgão linfóides como timo, bursa e baço com conseqüente redução na resposta primária de anticorpos (Heggen et al., 1998).

Baseado nas técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase, o TCoV realiza sua replicação primária, primeiramente nos enterócitos do jejuno e íleo, principalmente no ápice da velocidade intestinal, e no epitélio folicular e interfolicular da bursa de Fabrício. Em embriões inoculados, a replicação ocorre exclusivamente nas células do epitélio intestinal e epitélio da bursa de Fabrício (Guy, 2003).

As lesões macroscópicas são vistas primariamente nos intestinos e bursa de Fabrício. O duodeno e o jejuno ficam pálidos e flácidos e o ceco distendido e com conteúdo aquoso, acompanhados de atrofia de bursa, além de emaciação e desidratação.

As lesões microscópicas são observadas nos intestinos e bursa dos animais infectados. Nos intestinos ocorre encurtamento das vilosidades, o aprofundamento das criptas e diminuição do diâmetro intestinal. Observa-se a separação da lâmina própria dos enterócitos e sua infiltração por heterófilos e linfócitos. Mudanças nas células epiteliais também são vistas na bursa de Fabrício após dois dias pós-infecção, como necrose e hiperplasia, assim como a intensa inflamação heterofílica (Guy, 2003).

Não há vacinação para TCoV (Cavanagh, 2005a; Sellers et al., 2004), o que torna o controle da enfermidade muito importante, ainda mais porque o tratamento para a doença muitas vezes não obtém

sucesso e não existe tratamento que previna a infecção. A enterite por coronavírus não é facilmente eliminada em áreas com alta concentração de perus (Loa et al., 2006) e por isso deve-se aumentar o monitoramento quanto à presença do vírus nos lotes, e atuar com medidas preventivas e de biossegurança. Calibeo-Hayes et al., 2003; demonstraram que a mosca doméstica pode ser um potencial vetor mecânico e, portanto, um efetivo controle em áreas endêmicas de TCoV é dependente da população desses vetores, por meio do manejo do lixo, remoção adequada de aves mortas e uso de inseticidas.

Diante ao crescimento acentuado da produção de perus no mercado nacional, com destaque no mercado mundial, a detecção precoce do vírus por meio de diagnósticos rápidos, específicos e sensíveis, pode colaborar para que sejam tomadas medidas adequadas de biossegurança e profilaxia.

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 com a utilização da técnica de Dot-ELISA desenvolvida e padronizada para esse fim. Para tanto, os imunoreagentes foram produzidos e, a dose ótima dos mesmos, determinada por titulação em bloco. A técnica foi empregada em membranas de nitrocelulose, medindo 5cm. A membrana foi lavada com PBS tween e ativada com o tampão de transferência (Tris-Glicina-HCl) durante 1 hora, seguido da adsorção do anticorpo primário de captura (IgG de galinha anti-vírus da bronquite infecciosa-BI) diluído 1:100 em tampão carbonato-bicarbonato 0.2M pH 9.6 over-night. Após, as membranas foram novamente lavadas com PBS tween e bloqueadas com 15% de leite em pó sob agitação por 1 hora e submetidas a lavagens consecutivas com PBS adicionado de Tween. As suspensões de fezes foram diluídas em tampão Tris-HCl com 0.1% de soroalbumina bovina (SAB) durante 1h e adicionadas em um volume de 50µl por membrana ficando 18h em incubação. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada com PBS tween. Em seguida, o segundo anticorpo consistiu de gama globulina de galinha, anti-VBI acoplado a biotina, diluído 1:100 e incubadas por 2h sob agitação. Após este período houve nova lavagem com PBS tween. As reações foram reveladas com o conjugado streptoavidina + peroxidase e respectivo substrato, DAB (3,3'-diaminobenzindine) 60mg em 100ml de tampão Tris-HCl + 14µl de peróxido de hidrogênio a 3%. As reações consideradas positivas foram aquelas em que um pigmento marrom apareceu, e nas membranas negativas, foi observada a ausência do pigmento. Esta técnica possui a vantagem de ser mais econômica, fácil e rápida na sua execução, auxiliando o diagnóstico de um grande número de amostras.

Referências

- AVISITE Ciência & Tecnologia: Produção industrial de perus: características e exigências. Disponível na web <http://www.avesite.com.br/cet5/13/index.shtm> - acesso em 26/06/2006.
- CALIBEO-HAYES, D.; DENNING, S. S.; STRINGHAN, 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.; PAPINYO, 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 Enterites. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADRLY, A. M.; McDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. **Disease of Poultry**. Iowa state Press, 2003, p. 300-306.
- ISMAIL, M. .; CHO, K. O.; WARD, L. A.; SAIF, Y. M. Experimental bovine coronavirus in turkey poultrs and young chickens. **Avian Diseases**, v.47, p. 515-522, 2003.
- SELLERS, H.; KOCI, M. D.; LINNEMANN, E.; KELLEY, L. A.; SHULTZ-CHERRY, S. Development of a Multiplex Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction Diagnostic Test Specific for Turkey Astrovirus and Coronavirus. **Avian Diseases**, v. 48, p. 531-539, 2004.
- CAVANAGH, D. Coronaviruses in pultry and other birds. *Avian Pathology*, v. 34, n. 6, p. 439-448, 2005a.
- CAVANAGH, D. The Role of coronaviruses in enteric diseases od turkeys. In: PROCEEDINGS OF THE 24th TECHINICAL 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 Poults Associated with Exposure to Poult Enteritis and Mortality Syndrome. **Avian Diseases**, v. 42, p. 711-720, 1998.

Bolsa:FAPESP Processo número 06/51372-1

Orientadora: Prof. Dra. Tereza Cristina Cardoso

Orientada:Thais L.L. Castanheira