

CORONAVIRUS GRUPO 3: DETECÇÃO DO TCoV (*TURKEY CORONAVIRUS*) PROVENIENTES DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE PERUS (*Meleagris gallopavo*) COM QUADRO AGUDO DE ENTERITE. Deriane Elias Gomes, Tereza Cristina Cardoso, Anivaldo O C Júnior, Heitor Flávio Ferrari, Analy R Mendes. - Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal - Curso de Medicina Veterinária - Campus de Araçatuba.

O Complexo de Enterite de Perus (PEC) tem sido incriminado como uma das maiores causas de perdas econômicas em outros países, e especialmente, neste estudo, foi descrito causando diarreia, anorexia, perda de peso e mortalidade de 5% nos animais com sintomatologia aguda. Nos casos em que a mortalidade é alta, a doença pode ser classificada como Síndrome da Enterite Mortal das Aves (poult enteritis mortality syndrome - PEMS). Embora o agente etiológico (ou os agentes) que causa PEC não está definitivamente identificado, muitos vírus têm sido associados a doenças semelhantes ao PEC, incluindo o coronavírus de perus. Mais recentemente, a PEMS foi descrita afetando aves da Grã Bretanha resultando no primeiro relato desta doença. Os coronavírus têm sido descritos como vírus exigentes e, este problema surgiu da dificuldade que os virologistas vivenciaram para encontrar tipos celulares nos quais crescesse *in vitro*. Neste mesmo caminho, coronavírus de peru (TCoVs) não podem crescer em cultura celular, então seu diagnóstico é baseado na técnica de imunofluorescência indireta, ELISA comercial e pesquisas moleculares baseado em amostras clínicas e de campo. Foi realizada a detecção de coronavírus de perus (TCoV) em perus afetados com 30-120 dias de idade de uma determinada região produtora no Brasil. A RT-PCR foi aplicada em suspensões de intestinos (SI), respectivos conteúdos intestinais (CI), bursa de Fabrício (BF), fezes (F) e swabs cloacais (SC) para amplificar a região conservada 3'UTR e gene do nucleocapsídeo de TCoV. Os exames de histopatologia e imunohistoquímica direta foram realizados para detectar o antígeno TCoV a partir de lâminas de intestinos e bursas infectados. A examinação microscópica do intestino (junção íleo-cecal) revelou marcada degeneração e destruição do epitélio das vilosidades e hiperativação das glândulas intestinais. Infiltrado de células mononucleares na lâmina basal também foram observados. O lúmen intestinal estava cheio de descamação de células epiteliais e exsudato mucoso. Os folículos linfóides da Bursa de Fabrício mostraram destruição linfocitária e depleção especialmente na medula entre leve a moderado. Foi observado grande número de células linfoblásticas acompanhadas de atrofia folicular. Todos os resultados obtidos nos tecidos marcados, revelaram lesões consideradas terem sido causadas pela infecção por TCoV. A marcação positiva da imunohistoquímica direta estava presente em todas as lâminas de intestinos, entretanto, todas as bursa de Fabrício analisadas foram negativas. Os achados de RT-PCR foram positivos para TCoV em todas as amostras de fezes, e 27,27% das amostras de SC foram positivas para a região 3'UTR e região TCoV nucleocapsídeo. As amostras de soro (n=200), foram positivas para TCoV, com títulos variando de $\geq 2.0\text{Log}$ a 8.0Log usando o ELISA comercial IDEEX para IBV. Todas as análises de RT-PCR destas aves foram positivas quando FD, IS e IC foram analisadas. Finalmente, o melhor material de campo para o diagnóstico de TCoV foram as fezes (F) e/ou suspensão de intestinos (SI), resultando na primeira descrição de perus afetados no Brasil..

Referências Bibliográficas

- Adzhar, A., Shaw, K., Britton, P. & Cavanagh, D. (1996). Universal oligonucleotides for detection of infectious bronchitis virus by polymerase chain reaction. *Avian Pathology*, 25, 817-836.
- Breslin, J.J., Smith, L.G., Fuller, F.J. & Guy, J.S. (1999a). Sequence analysis of the matrix/nucleocapsid gene region of turkey coronavirus. *Intervirology*, 42, 22-29.
- Breslin, J.J., Smith, L.G., Fuller, F.J. & Guy, J.S. (1999b). Sequences analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid protein and 3' untranslated region identifies the virus as a close relative of infection bronchitis virus. *Virus Research*, 65, 187-193.
- Breslin, J.J., Smith, L.G., Barnes, H.J. & Guy, J.S. (2000). Comparison of virus isolation immunohistochemistry and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction procedures for detection of Turkey Coronavirus. *Avian Diseases*, 44, 624-631.
- Brown, T.P., Garcia, A.P. & Kelly, L. (1997). Spiking mortality of turkey poults: I. Experimental reproduction in isolation facilities. *Avian Diseases*, 41, 604-609.
- Cardoso, T.C., Sousa, R.M., Oliveira, C., Stringhini, G., & Pinto, A.A. (1999). A liquid phase-blocking ELISA for the detection of antibodies against bronchitis vírus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 748-752.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Shaw, K., Britton, P. & Naylor, C. (1997) Towards the routine application of nucleic acid Technology for avian disease diagnosis. *Acta Veterinaria Hungarica*, 45, 281-298.
- Cavanagh, D., Mawditt, K., Sharma, M., Drury, S.E., Ainsworth, H.L., Britton, P. & Gough, R.E. (2001). Detection of a coronavirus from turkey poults in Europe genetically related to infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Pathology*, 30, 365-378.
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, 34, 439-448.
- Gough, R.E., Alexander, D.J., Lister, M.S. & Cox, W.J. (1988). Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases of birds. *Avian Pathology*, 17, 893-907.
- Gough, R.E., Drury, S.E., Francesca, C., Britton, P. & Cavanagh, D. (2006). Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazon viridigenalis* Cassin). *Avian Pathology*, 35, 122-126.
- Culver, F., Dziva, F., Cavanagh, D., Stevens, M.P. (2006). Poult enteritis and mortality syndrome in turkeys in Great Britain. *Veterinary Record*, 159, 209-210.
- Guy, J.S., H.J., Barnes, Smith, L.G. & Breslin J. (1997). Antigenic characterization of a turkey coronavirus identified in poult enteritis- and mortality syndrome-affected turkeys. *Avian Diseases*, 41, 583-590.
- Guy, J. S. (2003). Turkey Coronavirus Enteritis. In Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadry, A. M., McDougald, L. R. & Swayne, D. E. (Eds) *Disease of Poultry*, 11th edn (pp.300-307). Ames: Iowa State University Press.
- Harlow, E. & Lane, D (1998). Labeling antibodies. In E Harlow & D Lanes, (Eds): *Antibodies: a laboratory manual*, edn (pp. 340-341). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Hussain J. & Nagaraja, K.V. (1993). A monoclonal antibody –based immunoperoxidase method for rapid detection of hemorrhagic virus of turkeys. *Research in Veterinary Science*, 55, 98-103.

- Ismail, M.M., Cho, K.O., Hasoksuz, M., Saif, L.J. & Saif, Y.M. (2001a). Antigenic and genomic relatedness of turkey-origin coronaviruses, bovine coronaviruses, and infectious bronchitis virus of chickens. *Avian Diseases*, 45, 978-984.
- Ismail, M.M., Cho, K.O., Ward, L.A. & Saif, Y.M. (2001b). Experimental bovine coronavirus in turkey poults and young chickens. *Avian Diseases*, 45, 157-163.
- Ismail, M.M., Tang, Y. & Saif, Y.M. (2003). Pathogenicity of Turkey Coronavirus in Turkeys and Chickens. *Avian Diseases*, 47, 515-522.
- Loa, C.C., Lin, T.L., Wu, C.C., Bryan, T.A., Thacker, H.L., Hooper, T., Schrader, D. (2000). Detection of antibody to turkey coronavirus by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay utilizing infectious bronchitis virus. *Avian Diseases*, 44, 498-506.
- Loa, C.C., Lin, T.L., Wu, C.C., Bryan, T.A.; Hooper, T. & Schrader, D. (2002). Specific mucosal IgA immunity in turkey poults infected with turkey coronavirus. *Veterinary Immunity and Immunopathology*, 88, 57-64.
- Loa, C.C., Lin, T.L., Wu, C.C., Bryan, T.A.; Hooper, T. & Schrader, D. (2006). Differential detection of turkey coronavirus, infectious bronchitis virus, and bovine coronavirus by a multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 131, 86-91.
- Psalla, D., Psychas, V., Spyrou, V., Billins, C., Papaioannou, N. & Vlemmas, I. (2006). Pathogenesis of experimental Encephalomyocarditis: a histopathological, Immunohistochemical and Virological study in Rats. *Journal Comparative Pathology*, 134, 30-39.
- Sellers, H., Koci, M.D., Linnemann, E., Kelley, L.A. & Shultz-Cherry, S. (2004). Development of a Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test Specific for Turkey Astrovirus and Coronavirus. *Avian Diseases*, 48, 531-539.
- Spackman, E., Kapczynski, D. & Sellers, H. (2005). Multiplex real-time reverse transcription-polymerase chain reaction for the detection of three viruses associated with poult enteritis complex: Turkey Astrovirus, Turkey Coronavirus and Turkey Reovirus. *Avian Diseases*, 49, 86-91.

Bolsa: PIBIC 2005/2006

Orientadora: Prof. Dra. Tereza Cristina Cardoso

Orientados: Anivaldo Olívio Corte Junior e Deriane Elias Gomes