

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA
VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR *IN SITU* NA
DETECÇÃO DA CO-INFECÇÃO PELO CORONAVIRUS
GRUPO 3 (TCOV) ASTROVÍRUS (TASTV-2) EM PERUS
COM QUADRO AGUDO DE ENTERITE**

Ana Carolina Guedes Rosa

Bióloga

ARAÇATUBA – SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA
VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR *IN SITU* NA
DETECÇÃO DA CO-INFEÇÃO PELO CORONAVIRUS
GRUPO 3 (TCOV) ASTROVÍRUS (TASTV-2) EM PERUS COM
QUADRO AGUDO DE ENTERITE**

Ana Carolina Guedes Rosa

Orientadora: Profa. Dra. Tereza Cristina Cardoso

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Curso de Medicina Veterinária, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

ARAÇATUBA – SP

2009

Catálogo na Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R788a Rosa, Ana Carolina Guedes.
Aplicação da técnica de RT-PCR in situ na detecção da co-
infecção pelo Coronavírus grupo 3 (TCoV) e Astrovírus (TAsV-2)
em perus com quadro agudo de enterite / Ana Carolina Guedes
Rosa. -- Araçatuba: [s.n.], 2009
52 f. : il. + 1 CD-ROM
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2009
Orientadora: Profa. Tereza Cristina Cardoso da Silva

1. Perus 2. Enterite transmissível dos perus 3. Coronavírus do
Peru 4. Síndrome de mortalidade do peruzinho por enterite

CDD 636.0896

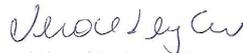
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Aplicação da técnica de RT-PCR in situ na detecção da co-infecção pelo coronavirus Grupo 3 (TCOV) astrovirus (TASTV) em em perus com quadro agudo de enterite.

AUTOR: ANA CAROLINA GUEDES ROSA

ORIENTADOR: Dr.^a TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL (MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E PRODUÇÃO ANIMAL) pela Comissão Examinadora.



Dr.^a VERA CLÁUDIA LORENZETTI MAGALHÃES CURCI



Dr.^a MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO



Dr.^a TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA

DATA DA REALIZAÇÃO: 18 de dezembro de 2009.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr.^a TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA
- Orientadora -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Ana Carolina Guedes Rosa – RG 25250993-6 e CPF 292914668-08 nascida em 04 de janeiro de 1980 na cidade de São José do Rio Preto, graduação em Ciências Biológicas pelo Centro universitários de Rio Preto (UNIRP) – SP, em 2003. Atualmente é bolsista de treinamento técnico III da FAPESP exercendo atividades de pesquisa no Laboratório de Virologia Animal, UNESP.

Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o
dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.
(Dalai Lama)

DEDICATÓRIA

- Dedico este trabalho primeiramente a Deus, pois sem Ele, nada seria possível e não estaríamos aqui reunidos, desfrutando juntos, deste momento tão importante.
- Aos meus pais, Delfim e Maria das Graças, ao meu irmão Delfim, e minha avó Loura que contribuíram para realização deste sonho.
- Aos meus amigos, pelo apoio, motivação.
- Dedico àqueles que me ajudaram, direta e indiretamente, na construção deste trabalho.
- E ainda dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam que a ousadia e o erro são caminhos para as grandes realizações.

AGRADECIMENTOS

- A Professora Doutora TEREZA CRISTINA CARDOSO, pela orientação, confiança, exemplo como pesquisadora, capacidade de orientação e incentivo em todos os momentos. Sem a sua disponibilidade e paciência eu não teria atingido este objetivo. Além disso, agradeço pela amizade conquistada neste período;
- A Professora Doutora MARIA CECÍLIA RUI LUVIZOTTO, pela colaboração nesse trabalho, além de todo apoio e amizade;
- Ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal do Curso de Medicina Veterinária da UNESP – Campus de Araçatuba pela aceitação do meu nome como aluna regular no Mestrado, e por tornar real mais uma conquista;
- Aos amigos que fiz junto ao Laboratório de Virologia do Curso de Medicina Veterinária da FOA – UNESP – Campus de Araçatuba: Deriane Elias Gomes, Gilmara Castilho, Camila da Silva Frade e Heitor Ferrari;
- À FAPESP pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
CAPÍTULO 1 – 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS	13
2. OBJETIVO	26
3. CONCLUSÃO	27
4. REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2 - ARTIGO	36
RT-PCR IN SITU HIBRIDIZAÇÃO NA DETECÇÃO DA CO-INFECÇÃO PELO CORONAVÍRUS GRUPO 3 (TCOV) E ASTROVÍRUS (TASTV-2) EM PERUS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS	
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1. PROCEDIMENTOS GERAIS	38
2.2. REAÇÃO DE RT-PCR E PRODUÇÃO DAS SONDAS BIOTINILADAS	38
2.3. REAÇÃO DE RT-PCR <i>IN SITU</i>	39
2.4. REAÇÃO DE HIBRIDIZAÇÃO	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4. REFERÊNCIAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

μ l - micro litro

μ g – microgramas

μ m – micrometros

cDNA – fita complementar do RNA

DAB – diaminobenzidina 3,3

DNA – ácido desoxirribonucléico

dNTP – deoxinucleotídeo

DTT – dethiltetriol

HE – hematoxilina-eosina

Imuno-MET – imunomicroscopia eletrônica de transmissão

IHQ – imunoistoquímica

ISH – hibridização *in situ*

kDa – quilodaltons

MET – microscopia eletrônica de transmissão

PEMS – síndrome da enterite e mortalidade dos perus

PCR – reação em cadeia da polimerase

PBS – solução tamponada de fosfato

pH – potencial hidrogeniônico

pb – pares de base

RT-PCR - transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase

RNA – ácido ribonucléico VI – Isolamento viral

SSC – solução citrato de sódio

SDS – dodecil sulfato sódio

TCov – coronavírus de perus

TAstV-2 – astrovírus de perus tipo2

Tris-HCl – hidróxido aminometano – ácido clorídrico

UI – unidade internacional

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: RT-PCR *insitu* hibridização do corte histológico da região da junção-íleo-cecal e ceco de perus experimentalmente infectados com TAstV-2(pág.44).

Figura 2: RT-PCR *insitu* hibridização do corte histológico da região da junção-íleo-cecal de perus experimentalmente infectados com TCoV(pág.45).

RESUMO

O presente estudo descreve o desenvolvimento e a aplicação da reação de transcrição reversa *in situ* em cadeia da polimerase (RT-PCR *in situ*), para detectar a co-infecção experimental de perus de 1-dia de idade com Coronavírus (TCoV) e Astrovírus (TAstV-2) isolados de casos clínicos no Brasil. A primeira etapa da reação consistiu na preparação específica de sondas de DNA biotiniladas homólogas ao gene da polimerase viral do TAstV-2 e da região 3'UTR do TCoV. Foram utilizados cortes histológicos de intestino correspondendo às regiões do íleo, junção íleo-ceco e ceco para avaliar a reação de RT-PCR *in situ*. Para permeabilização tecidual uma digestão foi aplicada com 10 µg/µl proteinase K por 30 min. Na etapa de hibridização, as sondas de DNA homólogo às regiões genômicas virais ligadas à biotina foram diluídas na concentração de 2µg/µl na solução de hibridização e incubadas overnight à 42°C. Em seguida, uma diluição ótima do anticorpo monoclonal anti-biotina acoplado a fosfatase alcalina e a peroxidase foram aplicados, para TAstV-2 e TCoV, respectivamente. O substrato diaminobenzidina 3,3 (DAB) e FastRed ® foram utilizados para identificar a hibridização das regiões homólogas correspondentes ao TCoV e TAstV-2, respectivamente. A reação positiva foi visualizada por deposição de pigmentos vermelhos (TAstV-2) e marrom acastanhado (TCoV). Em relação à localização dos genes virais amplificados, foram confirmados nas células da base (células caliciformes) e ao longo das vilosidades intestinais principalmente no citoplasma dos enterócitos de forma difusa para ambos os vírus. Marcações positivas também foram evidenciadas na submucosa próximas às regiões com intensa congestão vascular. Em conclusão, a técnica de RT-PCR *in situ* padronizada no presente estudo demonstrou boa capacidade de detectar RNA viral promovendo uma desejável associação entre o diagnóstico morfológico e molecular a ser utilizado na medicina veterinária.

Palavras chaves: Perus, enterite viral, diagnóstico, PEMS

ABSTRACT

This study describes the development and application of the reaction in situ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR in situ) to detect co-infection of turkeys to experimental 1-day-old with Coronavirus (TCoV) and Astrovirus (TAsV-2) isolated from clinical cases in Brazil. The first step of the reaction has been to prepare specific biotinylated DNA probes homologous to the viral polymerase gene of TAsV-2 and the 3'UTR region of TCoV. We used histological sections of intestine corresponding to the regions of the ileum, ileum-cecum junction and cecum to evaluate the reaction of RT-PCR in situ. For permeabilization tissue digestion was applied with 10 g / uL proteinase K for 30 min. In step hybridization, DNA probes homologous to the viral genomic regions linked to biotin were diluted to the concentration of 2µg/µl in hybridization solution and incubated overnight to 42 °C. Then, an optimal dilution of monoclonal anti-biotin coupled to alkaline phosphatase and peroxidase were applied to TAsV-2 and TCoV, respectively. 3.3 The substrate were used to identify the hybridization of diaminobenzidine (DAB) and FastRed homologous regions corresponding to TCoV and TAsV-2, respectively. The positive reaction was visualized by deposition of red pigment (TAsV-2) and brown brown (TCoV). Concerning the location of the amplified viral genes was confirmed by the base cells (goblet cells) and along the intestinal villi in the cytoplasm of enterocytes diffusely to both viruses. Tags positive were also demonstrated in the submucosa close to the areas with intense vascular congestion. In conclusion, the RT-PCR *in situ* standard in this study showed good ability to detect viral RNA promoting a desirable association between morphological diagnostics for use in veterinary medicine.

Key words: Turkeys, viral enteritis, diagnosis, PEMS

CAPÍTULO 1

1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A importância econômica e social da avicultura brasileira coloca o setor em evidência no âmbito nacional e internacional. Nesse sentido, o agronegócio avícola brasileiro movimentava em torno de 10 bilhões de dólares ao ano, representando 2% do PIB do país, além de empregar milhões de pessoas direta e indiretamente. A produção de perus vem crescendo nos últimos anos de maneira acentuada, demonstrando um acréscimo de 23% em 2008 sobre a produção de 2006. Em um estudo econômico mais recente, concluíram que foram destinadas para o mercado interno 161 mil toneladas de carne de perus do total produzido, e para o mercado externo 110,4 mil toneladas, gerando uma receita cambial de US\$ 152,3 milhões decorrentes das exportações (AVISITE, 2009)

Em face da não sazonalidade do consumo de seus subprodutos, a oferta, bem como a demanda de carne de perus, são acentuadas ao longo de todo o ano em nosso país. Além disso, a industrialização da carne de peru tem evoluído com maior participação na elaboração de produtos prontos, como patês, lasanhas, pizzas, muito solicitados pelo consumidor brasileiro em virtude da sua praticidade. Com isso, o Brasil consolidou a posição de terceiro maior produtor e exportador de perus, atrás apenas dos Estados Unidos e da União Européia, sendo responsável por 5,1% da produção mundial. No aspecto de comercialização internacional, o país abriu novos e importantes mercados, criando novas perspectivas de crescimento e participação no cenário mundial (AVESITE, 2009).

Nesse sentido, o *Coronavirus* dos perus (TCoV - Turkey Coronavirus) ocasiona uma doença entérica aguda e altamente contagiosa nas aves, inicialmente denominada de “doença da crista azul”, sendo esta primeiramente, identificada em perus em 1951 (SAIF et al., 1990; GUY et al., 1997). Nas décadas de 1950 e 1960, nos Estados Unidos e Canadá, as severas perdas econômicas foram atribuídas à “doença da crista azul”, assim como 23% de toda a mortalidade dos plantéis de perus em Minnesota-USA. Esforços para identificar a etiologia da “doença da crista azul” que perdurou por um período de 20 anos, até que em 1973, finalmente, o *Coronavirus* grupo III foi incriminado como o agente etiológico (GUY et al., 2004).

Segundo o Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (ICTV), os *Coronavirus* são classificados na ordem *Nidovirales*, família *Coronaviridae*, na qual

compreende os gêneros *Coronavirus* e *Torovirus*. O gênero *Coronavirus* é subdividido em três grupos definidos de acordo com diferenças antigênicas identificadas por análises sorológicas, análises nas seqüências de nucleotídeos, epítomos presentes na glicoproteína do envelope e também hospedeiros naturais (CAVANAGH & NAQI, 1997). Os *Coronavirus* do grupo I e II podem infectar muitas espécies de mamíferos, incluindo humanos, suínos, cães, gatos, equinos, bovinos e roedores. Os *Coronavirus* do grupo III podem infectar aves domésticas, incluindo o vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV), *Coronavirus* dos perus (TCoV) e *Coronavirus* dos faisões (PhCoV) (CAVANAGH & NAQI, 1997; CAVANAGH & DAVIS 1998; BRESLIN et al., 1999; CAVANAGH et al., 2002; LIN et al., 2002).

As doenças predominantemente associadas aos *Coronavirus* são infecções entéricas e respiratórias, entretanto doenças hepáticas e neurológicas podem ocorrer. O IBV causa uma doença respiratória aguda nas galinhas, enquanto que o TCoV causa enterite nos perus (SCHULTZ-CHERRY et al., 2000).

As partículas virais dos *Coronavirus* são envelopadas, possuindo como genoma uma fita de RNA simples, não segmentada com sentido positivo, com morfologia normalmente caracterizada de pleomórficos quando observados à microscopia eletrônica. O diâmetro da partícula viral varia entre 50 a 150 nm. O virion possui um envelope formado por uma bi-camada lipídica da qual se projetam as proteínas da matrix viral (M), glicoproteína (Spike protein - S), hemaglutinina estearase (HE – 120-140 kilodaltons [kDa]), dando uma aparência morfológica de coroa solar (do latim corona). As três maiores proteínas estruturais da partícula viral incluem a S (90-180 kDa), M (20-35 kDa) e a proteína do nucleocapsídeo (N – 50-60 kDa) (GUY, 2000).

A hemaglutinina estearase (HE) é uma proteína exclusiva dos *Coronavirus* do grupo II, sendo este um gene homólogo ao do vírus da Influenza tipo C, sugerindo que o precursor dos *Coronavirus* do grupo II adquiriu HE como resultado de eventos de recombinação num hospedeiro com dupla infecção (LOA et al., 2004; ISMAIL et al., 2001)

A proteína S (glicoproteína) é a principal proteína estrutural do envelope. Esta confere a aparência espiculada do virion, e é o principal alvo para anticorpos neutralizantes. Contém epítomos específicos, sendo altamente variáveis entre os diferentes *Coronavirus*. A subunidade S2 forma a haste da espícula, responsável pela fusão de membranas e formação de sincícios. A subunidade S1 forma o bulbo

da proteína S, é muito mais variável que a subunidade S2, e apresenta a função biológica de ligação do vírus às células pela fusão do envelope viral com a superfície celular. Em contraste, as proteínas M e N são mais conservadas entre os diferentes grupos antigênicos. A proteína M tem como função principal a montagem da partícula viral, formando a estrutura do envelope (ISMAIL et al., 2001). A proteína não-estrutural mais estudada dos *Coronavirus* é a RNA polimerase RNA-dependente, que é produto do gene 1 (*pol*). Esta proteína é responsável pela transcrição e replicação viral, sendo altamente conservada mesmo entre espécies de grupos diferentes entre os *Coronavirus* (STEPHENSEN et al., 1999).

Baseado nas técnicas de imunofluorescência e imunoperoxidase, o TCoV realiza sua replicação primária, primariamente nos enterócitos do jejuno e íleo, predominantemente no ápice da vilosidade intestinal, e no epitélio folicular e inter-folicular da bursa de Fabricius. Em embriões inoculados, a replicação ocorre exclusivamente nas células do epitélio intestinal e epitélio da bursa de Fabricius. O processo de transcrição viral ocorre no citoplasma celular, e o TCoV adquire o envelope pelo processo de brotamento, adquirindo membranas lipoproteicas do retículo endoplasmático e aparelho de Golgi (CAVANAGH & NAQI, 1997) .

As lesões macroscópicas são vistas primariamente nos intestinos e bursa de Fabricius. Nesse sentido, duodeno e jejuno geralmente ficam pálidos e flácidos, e o ceco distendido e com conteúdo aquoso, acompanhados de atrofia de bursa, além de emaciação e desidratação (JINDAL et al., 2009a).

As lesões microscópicas são observadas nos intestinos e bursa dos animais infectados. Nos intestinos ocorre o 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, células de defesa. Mudanças nas células epiteliais também são vistas na bursa de Fabricius após dois dias de infecção, como necrose e hiperplasia, assim como intensa inflamação heterofílica (SAIF et al., 1985).

A enterite por TCoV afeta perus de todas as idades e tem período de incubação de um a cinco dias, com morbidade podendo chegar a 100% e a mortalidade pode estar associada a aves jovens, variando entre <10 a 50 % ou mais, e em aves adultas ela é debilitante. Os perus com enterite por *Coronavirus*

apresentam depressão, anorexia, hipotermia, desidratação, perda de peso e secreção nasal (CATTOLI et al., 2006; CULVER et al., 2006).

O vírus também tem sido associado como um dos agentes envolvidos na “Síndrome da Enterite e Mortalidade dos Perus (PEMS - *Poult Enteritis and Mortality Syndrome*), uma doença caracterizada por alta mortalidade, severo déficit no crescimento e imunodisfunção, resultado da atrofia dos órgãos linfóides como timo, bursa e baço, por estes serem alvos dos agentes da PEMS, com consequente redução na resposta primária de anticorpos (SAIF, 1985).

A etiologia da PEMS, ainda, é desconhecida. Muitos agentes virais, incluindo *Coronavirus*, Vírus da doença infecciosa da bursa, *Rotavirus* (grupo D), *Reovirus* e *Adenovirus* têm sido identificados em perus com PEMS. Além do *Coronavirus*, outro vírus fortemente associado à PEMS é um *Astrovirus*. Além disso, bactérias podem exacerbar as conseqüências de uma infecção viral, entre elas a *Escherichia coli* (JINDAL et al., 2009a). Na Carolina do Norte, aonde se concentram os maiores grupos de pesquisa na área, o TCoV foi identificado em 63% dos lotes apresentando PEMS (SCHULTZ-CHERRY et al., 2000; JINDAL et al., 2009b).

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. 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 et al., 1997).

Não existe vacinação para TCoV, sendo o controle da enfermidade muito importante, uma vez que o tratamento para a doença geralmente não obtém sucesso, e não há medicamento que previna a infecção. Além disso, a enterite por *Coronavirus* não é facilmente eliminada em áreas com alta concentração de perus. Portanto, deve-se aumentar o monitoramento quanto à presença do vírus nos lotes, e atuar com medidas preventivas, onde as de higiene são fundamentais (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007). Os animais devem, preferencialmente, ser separados por idade, pois este é um elemento essencial para reduzir a incidência da doença. Outras medidas de biossegurança devem ser tomadas, como remoção de aves mortas, diminuição do tráfico motorizado nos locais, desinfecção de veículos e sapatos, considerando que o vírus é excretado em grandes quantidades nas fezes, qualquer criatura, inclusive os humanos podem espalhar a doença, além de outros

animais domésticos. O *Coronavirus* bovino (BCoV), em infecções experimentais, foi capaz de causar a doença em perus (ISMAIL et al., 2001), portanto deve-se obter medidas de segurança quando houver tráfego entre essas duas espécies.

Durante a década de 1980, análises sorológicas indicavam que o TCoV era antigenicamente próximo ao BCoV, sendo colocado no mesmo grupo II do *Coronavirus*. Esta classificação permaneceu até o final da década de 1990, quando pesquisas demonstraram que os *Coronavirus* isolados de casos de enterite em perus, são geneticamente e antigenicamente similares ao vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV - infectious bronchitis virus) (GUY et al., 1997; LOA et al., 2004; BRESLIN et al., 1999). Os resultados revelaram a existência de 85 a 90% de similaridade em ambos os vírus estudados, principalmente, nos genes que codificam as proteínas M e N sendo uma porcentagem alta, já que estirpes de IBV diferem entre si na mesma proporção. Na região gene que codifica a glicoproteína (spike gene), onde recentes estudos revelaram que TCoV e IBV possuem 34% de similaridade, sendo esta baixa se comparada entre as estirpes de IBV que possuem similaridade, entre si de 75 a 85%, e em alguns sorotipos 60% (GUY et al., 2000).

Breslin et al. (1999) demonstraram também que a região 3'UTR (untranslated region) possui 90,8 - 96,0% de similaridade entre os tipos de TCoV quando comparados entre si, 78,5 - 94,4% de similaridade com o IBV e menos de 30% de similaridade com BCoV.

A organização genômica do IBV é: 5'-replicase- S-3-M-5-N-3'UTR. Da mesma forma, os *Coronavirus* dos perus e dos faisões apresentam a mesma estrutura: 5'-replicase-S-3-M-5-N-3'-UTR. Conseqüentemente, a classificação ficou mais clara onde tanto o IBV, como o TCoV e PhCoV foram classificados no mesmo grupo 3 (CAVANAGH et al., 2002), diferentemente dos *Coronavirus* dos mamíferos, que por sua vez, são sub-divididos em grupo I e II (CAVANAGH et al., 2002 apud ENJUANES & CAVANAGH, 2001). O sequenciamento também demonstrou que estes três *Coronavirus*, de perus, faisões e galinhas possuem 97% de homologia em seu genoma, portanto, são muito semelhantes. Entretanto, quando se avaliam seus aspectos biológicos, podem ser observadas diferenças marcantes. Diante das análises antigênicas e levando-se em consideração a genética dos *Coronavirus* do grupo III, foram evidenciadas cinco espécies de aves susceptíveis ao mesmo

Coronavirus, semelhantes ao IBV, na Europa e USA (CAVANAGH et al., 1997; CAVANAGH et al., 2002).

A extensão da infecção por *Coronavirus* em perus, além da Inglaterra e América do Norte, era desconhecida (CULVER et al., 2006), até 2007, quando Teixeira et al. (2007) descreveram a sua ocorrência pela primeira vez. O diagnóstico da infecção por TCoV geralmente necessita de suporte laboratorial, assim como outros patógenos de perus que podem provocar sinais clínicos e lesões semelhantes. Os meios de diagnóstico são baseados no isolamento viral (IV), microscopia eletrônica (ME), sorologia, ou identificação de antígenos ou RNA viral de tecidos ou conteúdos intestinais, bem como da bursa de Fabricius (WOOLCOCK & SHIVAPRASAD, 2008; CARDOSO et al., 2008)

Além do isolamento viral, os meios diagnósticos mais frequentemente utilizados para detectar infecção por TCoV são a imunofluorescência (IF) direta e indireta em cortes de congelação, a imunoperoxidase (IP), microscopia eletrônica (ME), imuno ME, ELISA de captura e a reação de PCR (WOOLCOCK & SHIVAPRASAD, 2008).

Teste de imunofluorescência indireta e Imunoperoxidase são baseados em métodos com anticorpos que são mais simples e mais rápidos do que o isolamento do vírus, mas a sensibilidade é muito baixa. A partir da disponibilidade de informações das sequências TCoV, a RT-PCR tem sido desenvolvida por apresentar alta especificidade e sensibilidade. A RT-PCR tem sido utilizada para a detecção TCoV em amostras fecais e conteúdo intestinal de perus infectados (BRESLIN et al., 2000; LOA et al., 2006a; CARDOSO et al., 2008).

A técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para detecção de ácidos nucleicos de amostras clínicas tem a vantagem de ser mais sensível e específica se comparada com outros métodos diagnósticos convencionais (BRESLIN, et al., 1999). Entretanto, a sensibilidade e especificidade da PCR podem ser influenciadas pela natureza das amostras, pois algumas amostras podem conter inibidores inespecíficos da polimerase usada na técnica, diminuindo a sensibilidade da PCR, sendo que para mantê-la alta, pode ser necessária a purificação prévia do DNA/ RNA para remover estes inibidores, evitando resultados falso-negativos.

Para se detectar *Coronavirus* das aves pela técnica de RT-PCR, muitos isolados de IBV, TCoV e PhCoV foram seqüenciados, principalmente a região da

glicoproteína (S). Em virtude da alta variabilidade deste gene entre os vírus, ele não é o mais adequado para selecionar as seqüências com as quais são feitos os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a detecção dos *Coronavirus* do grupo III. A outra região mais seqüenciada é a do gene no nucleocapsídeo N e da região 3'UTR. Os nucleotídeos da região 3'UTR é uma das partes mais conservadas do genoma do IBV, sendo essencial para replicação. A partir disto, foram desenhados *primers* UTR3-/UTR4+ para detectar 25 isolados diferentes de IBV, então estes foram modificados com seqüências adicionais dando origem aos *primers* UTR11-/UTR41+ tornando-se viáveis para detecção de TCoV e outras novas estirpes de IBV. Os *primers* UTR11-/UTR41+ têm demonstrado serem efetivos e sensíveis para a RT-PCR, sendo utilizados para diversas espécies de aves confirmando a natureza altamente conservada da região 3'UTR (ADZAR et al., 1996). Devido à similaridade genômica e antigênica do IBV e TCoV, a técnica de RT-PCR para detecção de TCoV em perus foi desenvolvida com *primers* previamente utilizados para a detecção do IBV (TEIXEIRA et al., 2007)

Stephensen et al. (1999) utilizaram os *primers* 2Bp e 4Bm para amplificar uma região conservada do gene RNA-dependente de RNA polimerase (gene *pol*) entre diferentes *Coronavirus* que, inicialmente, foram utilizados para diagnósticos de TCoV a partir de amostras intestinais. Entretanto, os resultados dessas reações de PCR não foram consistentes em muitas triagens. Além do mais, os ciclos utilizados foram longos e complicados em comparação com a utilização de outros *primers* descritos em outros estudos. Nesse sentido, Breslin et al. (1999) demonstraram através de estudos que RT-PCR é um método sensível e específico para detectar TCoV de conteúdos intestinais, sendo mais sensível que a imunistoquímica, menos laboriosa e menos dispendiosa de tempo que o isolamento viral, pois a RT-PCR pode ser completada num período de 24 horas, sendo portanto uma alternativa para os procedimentos convencionais de diagnóstico.

Recentemente foi descrito o método de RT-PCR em tempo real para detecção específica de TCoV usando sondas fluorescentes duplamente marcadas. Este, por sua vez, foi empregado para detecção e quantificação do RNA viral (TCOV) em fragmentos intestinais, *swabs* cloacais de fezes e excrementos fecais. A utilização de primers desenhados e sondas podem distinguir TCoV de outros agentes patogênicos, incluindo *E. coli*, *Salmonella*,

rotavírus, reovírus, enterovírus, vírus da gripe aviária, doença de Newcastle vírus, herpesvírus, e outros coronavírus (CCoV, BCoV, TGEV, FIPV e IBV) (CHENG et al., 2009).

Outro agente infeccioso, incriminado de participar dos quadros de enterite em perus, agravando os sintomas da PEMS, é o *Astrovirus* dos perus (TAsTV-Turkey *Astrovirus*). Este agente viral foi primeiramente identificado em 1980 (THOUVENELLE et al., 1995), em amostras clínicas de fezes de perus com quadros de diarreia e, subsequentemente, em estudos experimentais, que o incriminaram como um dos principais, e em alguns casos, um agente secundário associado aos TCoV nos quadros de PEMS nos USA (KOCI & SCHULTZ-SCHERRY, 2002). Os estudos direcionados na busca da identificação dos TAsTV continuaram desde a década de 80, até recentemente, ser isolado de quadros de PEMS (BEHLING-KELLY et al., 2002; KOCI & SCHULTZ-CHERRY, 2002). Este novo vírus foi denominado de TAsTV-2, por ser geneticamente diferente do descrito previamente, compartilhando somente 35% da seqüência genômica do seu capsídeo com o TAsTV-1 (TANG & SAIF, 2004; TANG et al., 2005a; TANG et al., 2005b; TANG et al., 2006).

Os *Astrovirus* são partículas não envelopadas com RNA de sentido positivo e fita simples 6.8 a 7.9 Kb de comprimento com a terminação 3' poliadenilada. Na região adjacente a esta região *poly* (A) cerca de 110 nucleotídeos dos astrovírus humanos (HastV) são altamente conservados. Segundo relatam Koci & Schultz-Cherry (2002) o segmento genômico dos *Astrovirus* aviários basicamente compreende uma região 5' não traduzida (5'UTR) , seguido de três regiões de leitura, seguida da região 3'UTR e finalizando a cadeia de poly (A). Nesse sentido, Johansen et al (1998) revelaram através de seqüenciamento a existência de uma região RNA motif inserida na terminação 3'UTR comum aos *Astrovirus*, *Coronavirus* do grupo III (vírus da bronquite infecciosa das galinhas) e rhinovírus eqüino, sugerindo uma recombinação nos respectivos ancestrais virais. Um fato importante na estrutura dos astrovírus é a ausência da região s2m na terminação 3'UTR, presente em outros subtipos aviários e mamíferos, e presente também nos *Coronavirus* pertencentes ao grupo III. Dessa forma, oligonucleotídeos direcionados para esta região diferenciam estes agentes virais entre si tornando-se uma ferramenta

importante no controle das reações de RT-PCR em geral (SELLERS et al., 2004; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Em avicultura, os AstV estão associados a problemas sanitários graves em perus, o que pode acarretar em um aumento dos índices de mortalidade nos surtos de enterites. O primeiro protótipo deste vírus foi isolado e identificado como TAstV-1 em 1980, e duas décadas após, isolou-se o TAstV-2 nos USA, proveniente de perus com quadros de enterite apresentando alterações no timo e na bursa de Fabricius (SCHULTZ-CHERRY et al., 2000). Recentemente, Tang et al. (2005) demonstraram que os dois isolados TAstV 1987 e TAstV 2001 classificados em dois sorotipos na vírus neutralização, são 73.3% idênticos na análise de nucleotídeos e 82,8% nos aminoácidos. Na tentativa de elucidar esses achados, Pantin-Jackwood et al. (2006) analisaram a diversidade genética dos isolados de TAstV-2 nos USA dos genes polimerase e do capsídeo. Os resultados obtidos foram surpreendentes, onde foram evidenciados rearranjos entre genes da polimerase e do capsídeo de isolados coletados de diferentes lotes em uma mesma propriedade, no mesmo dia. Apesar do gene da polimerase, neste estudo apresentar mais estabilidade e ser mais conservado, técnicas de RT-PCR têm sido desenvolvidas e padronizadas nos genes do capsídeo viral (SAIF et al., 2005; LOA et al., 2006).

Até a presente data, o método de diagnóstico mais utilizado na detecção de TAstV, causando infecção em perus, é a microscopia eletrônica. Entretanto, somente 10% das partículas virais analisadas ao microscópio eletrônico apresentam o formato de estrelas com cinco ou seis pontos bem distintos, tornando esta metodologia pouco confiável. Ademais, os custos que envolvem o diagnóstico de lotes de perus com o uso de microscopia eletrônica são inviáveis em termos práticos (KOCI & SCHULTZ-CHERRY, 2002).

A técnica de imunofluorescência tem sido descrita como uma metodologia não aplicável à detecção de *Astrovirus* em materiais clínicos, o que difere dos TCoV, onde os cortes de congelamento são comumente utilizados para diagnóstico pelo uso da imunofluorescência (KOCI et al., 2000). Neste contexto, as técnicas moleculares, tal como a RT-PCR simples ou multiplex RT-PCR têm sido empregada, como a única ferramenta de diagnóstico na detecção de *Astrovirus* em perus (KOCI et al., 2000; MATHEW et al., 2000; JOHANSEN et al., 2001;

JONHANSEN et al., 2003; SELLERS et al., 2004a; SELLERS et al., 2004b; SPACKMAN et al., 2005a; SPACKMAN et al., 2005b; TANG et al., 2005; TANG et al., 2005; PANTIN-JACKWOOD et al., 2006a; PANTIN-JACKWOOD et al., 2006b; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008a; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008b; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2009).

Em um levantamento de doenças entéricas, é comum a detecção do astrovírus em 78 a 100% dos planteis de perus, e também se sido associado com a PEMS (SAIF et al., 1985; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008a; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008b). Infecções por *Astrovirus* em perus causam uma diminuição significativa na absorção intestinal de D-xylose e também uma diminuição específica na atividade da maltase resultando em má digestão de dissacarídeos e subsequentemente diarreia osmótica (THOUVENELLE et al., 1995). Em recentes estudos tem sido demonstrado que os *Astrovirus* podem aumentar a permeabilidade da barreira intestinal, o que poderia levar ao aumento da secreção de fluidos para o lúmen intestinal. (KOCI et al., 2004). Segundo Pantin-Jackwood et al. (2008a) o principal local de replicação do vírus é no citoplasma das células epiteliais (enterócitos) responsáveis pela absorção de nutrientes no jejuno, entretanto a replicação viral também pode ocorrer nas células da cripta, mas não é comum, bem como em outras porções do intestino.

O TAsTV pode ser isolado em ovos embrionados de galinhas e de perus pela inoculação de suspensões clínicas na cavidade amniótica ou alantóide, entretanto testes sorológicos que evidenciem anticorpos produzidos pela infecção são ainda inexistentes. Os *Astrovirus* em geral são altamente resistentes as condições ambientais e sobrevivem a tratamentos com os mais diversos tipos de desinfetantes, propriedades biológicas semelhantes aos picornavírus e o vírus da anemia aviária (SCHULTZ-CHERRY et al., 2001).

Esses mesmos resultados foram encontrados quando foram submetidas partículas virais purificadas de TAsTV a inativação com 10% de hipoclorito, entretanto sensível a 0.3% formaldeído, 1.5% Virkon, 0.1% de β -propiolactona e 90% de álcool metílico. Os TAsTV são, da mesma forma, altamente resistentes a temperaturas muito elevadas e pH muito baixos (SCHULTZ-CHERRY et al., 2001).

Outro fato interessante foi a recente descoberta que diferenças genéticas na composição do capsídeo viral não interferem na patogenia do TAsTV-2 (PANTIN-

JACKWOOD et al., 2008a). Nesse sentido, trabalhos anteriores que demonstraram diferenças quanto a patogenia do TAstV-1 e TAstV-2 (KOCI et al., 2003). Ademais, em um estudo quanto a presença de agentes virais como TCoV, Reovirus, Rotavírus e TAstV-1 e 2, em lotes de perus sadios até 60 dias, os mais freqüentes foram TAstV-2 e o *Rotavirus* (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008b; JINDAL et al., 2009a; JINDAL et al., 2009b).

Em face da importância econômica, que esta doença causa nas aves acometidas, estudos experimentais têm sido conduzidos, descrevendo os principais efeitos patológicos e, propriamente a patogenia da infecção pelos TAstV-2. A localização das partículas virais pela técnica de *in situ* hibridização (ISH) em perus experimentalmente infectados com a estirpe TAstV-2 isolado nos USA foram detectadas (BEHLING-KELLY et al., 2002). No terceiro dia após a infecção, intestinos, bem como o ceco, apresentaram lesões macroscópicas de paredes dilatadas e finas, com abundante conteúdo intestinal, aquoso, amarelado com odor, e vesícula aumentada de tamanho. O timo e a bursa de Fabrícus apresentaram atrofia, quando comparada com o controle. Trabalhos mais recentes evidenciaram que o TAstV-2 ocasiona diarreia, sem entretanto, ocasionar inflamação e morte celular por apoptose (KOCI et al., 2003).

Diante de todo exposto e, face aos escassos trabalhos existentes com TCoV e TAstV-2 no Brasil, aliado ao crescimento acentuado da produção de perus no mercado nacional, com destaque no mercado mundial, decidimos empreender a presente investigação que visa detectar a co-infecção de TCoV e TAstV-2 em perus experimentalmente infectados pela técnica de RT-PCR *in situ* hibridização. Ademais, é importante determinar a ocorrência destes agentes virais envolvidos nos quadros de enterite e diarreia com concomitante análise histopatológica, no sentido de se evitar no Brasil a ocorrência das sérias perdas econômicas encontradas nos Estados Unidos e Canadá. Neste sentido, a detecção precoce do vírus por meio de métodos de diagnóstico rápidos, específicos e sensíveis, pode colaborar para que sejam tomadas medidas adequadas de biossegurança no controle e profilaxia da doença.

2. OBJETIVO

Detectar a presença de RNA viral correspondente a região 3`UTR do TCoV e gene da polimerase viral do TAsTV-2 em cortes histológicos com o uso da técnica de RT-PCR *in situ* em cortes histológicos das porções do intestino (íleo e junção íleo cecal e ceco).

3. CONCLUSÃO

A técnica de RT-PCR *in situ* hibridização padronizada na presente investigação foi capaz de evidenciar RNA viral (TCoV e TAstV-2) no citoplasma dos enterócitos, predominante na região da junção íleo-cecal de perus experimentalmente infectados.

4. REFERÊNCIAS

ADZHAR, A., SHAW, K., BRITTON, P., CAVANAGH, D. Universal oligonucleotides for the detection of Infectious Bronchitis Virus by the polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v. 25, p. 817-836, 1996.

AVISITE Ciência & Tecnologia: produção industrial de perus: características e exigências. Disponível em: <<http://www.avesite.com.br/cet/5/13/index.shtm>> Acesso 30 setembro 2009.

BEHLING-KELLY, E.; SHULTZ-CHERRY, S.; KOCI, M.; LARSEN, D., BROWN, C. Localization of Astrovirus in experimentally infected turkey as determined by in situ hybridization. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 595-598, 2002.

BRESLIN, J. J.; SMITH, L. G.; FULLER, F. J.; GUY, J. S. Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid gene and 3' untranslated region Identifies the virus as a close relative of Infectious Bronchitis Virus. **Virus Research**, v. 65, p. 187-198, 1999.

CAPUA, I.; MINTA, Z.; KARPINSKA, E.; MAWDITT, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D.; GOUGH, R. E. Co-Circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). **Avian Pathology**, v. 28, p. 587-592, 1999.

CARDOSO, T. C., CASTANHEIRA, T. L. L., TEIXEIRA, M. C. B., ROSA, A. C. G., HIRATA, K. Y., ASTOLPHI, R. D., LUVIZOTTO, M. C. R. Validation of an immunohistochemistry assay to detect turkey coronavirus: a rapid and simple screening tool for limited resources settings. **Poultry Science**, v. 87, p. 1347-1352, 2008.

CATTOLI, G.; BATTISTI, C. D. E.; TOFFAN, A., SALVIATO, A., LAVAZZA, A.; CERIOLLI, M.; CAPUA, I. Co-circulation of distinct lineages of astroviruses in turkey and guinea fowl. **Archives of Virology**, v. 152, p. 595-602, 2006.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHAW, K.; BRITTON, P.; NAYLOR, C. Towards the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 45, n. 3, p. 281-298, 1997.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from Pheasants (*Phasianus Colchicus*) are genetically closely related to coronavirus of domestic fowl (Infectious Bronchitis Virus) and turkey. **Avian Pathology**, v. 31, p. 81-93, 2002.

CAVANAGH, D.; DAVIS, P. J. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes. **Journal of General Virology**, v. 69, p. 621-629, 1998.

CAVANAGH, D.; NAQI, A. S. Infectious Bronchitis. In: C.W. Calnek, HJ. Barnes, Lr Mcdougald & Ym Saif (Eds). **Diseases of Poultry, 10th Edn.** (pp 511-526) Ames, IA: Iowa State University Press, 1997.

CHENG, Y. N.; WU, C. C.; BRYAN, T.; HOOPER, T.; SCHRADER, D.; LIN, T. S. Specific real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection and quantitation of turkey coronavirus RNA in tissues and feces from de turkeys infected with turkey cononavirus. **Journal of Virological Methods**, DOI 10.1016/j.jviromet.2009.11.012, 2009.

CULVER, F.; DZIVA, F.; CAVANAGH, D.; STEVENS, M. P. Poults enteritis and mortality syndrome in turkeys in Great Britain. **Veterinay Record**, v. 159, p. 209-210, 2006.

GUY, J. S. Turkey coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses. **Avian Pathology**, v. 29, p. 206-212, 2000.

GUY, J. S.; BARNES, J.; SMITH, L. G.; BRESLIN, J. Antigenic characterization of a turkey coronavirus identified In Poult Enteritis-And Mortality Syndrome-Affected Turkey. **Avian Diseases**, v. 41, p. 583-590, 1997.

GUY, J. S.; MILES, A. M.; SMITH, L.; FULLER, F. J.; SCHULTZ-CHERRY, S. Antigenic and genomic characterization of turkey enterovirus-like virus (North

Carolina, 1988 Isolate): Identification of the virus as turkey astrovirus 2. **Avian Diseases**, v. 48, p. 206-211, 2004.

ISMAIL, M. M.; CHO, K. O.; HASOKSUZ, M.; SAIF, L. I.; SAIF, Y. M. Antigenic and genomic relatedness of turkey origin coronavirus, bovine coronavirus and infectious bronchitis virus of chickens. **Avian Diseases**, v. 45, n. 4, p. 978-84, 2001.

JINDAL, N.; PATNAYAK, D. P.; LAGO, A.; GOYAL, S. M. A retrospective study on poult enteritis syndrome in Minnesota. **Avian Diseases**, v. 53, n. 2, p. 268-275, 2009b.

JINDAL, N.; PATNAYAK, D. P.; ZIEGLER, A. F.; LAGO, A.; GOYAL, S. M. Experimental reproduction of poult enteritis syndrome: Clinical findings, growth response, and microbiology. **Poultry Science**, v. 88, p. 949-958, 2009a.

KOCI, M. D., KELLEY, L. A., LARSEN, D., SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus-induced synthesis of nitric oxide contributes to virus control during infection. **Journal of Virology**, 78:1564-1574, 2004.

KOCI, M. D.; MOSER, L. A.; KELLEY, L. A.; LARSEN, D.; BROWN, C. C.; SCHULTZ-CHERRY. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. **Journal of Virology**, v. 77, p. 11798-11808, 2003.

KOCI, M. D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Avian Astroviruses. **Avian Pathology**, v. 31, p. 213-227, 2002.

KOCI, M. D.; SEAL, B. S.; SCHULTZ-CHERRY, S. Development of an RT-PCR diagnostic test for an avian astrovirus. **Journal Virological Methods**, v. 90, p. 79-83, 2000.

LIN, T. L.; LOA, C. C.; WU, C. C. Existence of gene 5 indicates close genomic relationship of turkey coronavirus to infectious bronchitis virus. **Acta Virologica**, v. 46, n. 2, p.107-116, 2002.

LOA, C. C.; LIN, T. L.; WU, C. C.; BRYAN, T. A.; THACKER, H. L.; HOOPER, T.; SCHRADER, D. Expression and purification of turkey coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia coli*. **Journal Virological Methods**, v. 116 , p.161-167, 2004.

MATTHEW, D. K.; SEAL, B. S.; SCHULTZ-CHERRY, S. development of an RT-PCR diagnostic test for avian astrovirus. **Journal Virological Methods**, v. 90; p. 79-83, 2000.

M McNULTY, M. S.; CURRAN, W. L.; MCFERRAN, J. B. Detection of astroviruses in turkey faeces by direct electron microscopy. **Veterinary Record**, v. 106, p. 561, 1980.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; DAY, J. M.; JACKWOOD, M. W.; SPACKMANN, E. Enteric virus detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. **Avian Diseases**, v. 52, n. 2, p. 235-244, 2008b.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; DAY, J. M. Pathogenesis of type 2 astroviruses with variant capsid genes in 2-day-old specific pathogen free poult. **Avian Pathology**, v. 37, p. 193-201, 2008a.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; DAY, J. M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. **Avian Diseases**, v. 51, p.149-164, 2007.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; WOOLCOCK, P. R. Molecular characterization and typing of chicken and turkey Astroviruses circulating in the United States: implications for diagnostics. **Avian Diseases**, v. 50, p. 397-404, 2006b.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; WOOLCOCK, P. R. Phylogenetic analysis of turkey astroviruses reveals evidence of recombination. **Virus Genes**, v. 32, p.187-192, 2006a.

SAIF, L. J.; SAIF, Y. M.; THAIL, K. W. Enteric viruses in diarrheic turkey poult. **Avian Diseases**, v. 29, p. 798-811, 1985.

SAIF, Y. M.; SAIF, L. J.; HOFARCE, C. L.; HAYHOW, C.; SWAYNE, D. E.; DEARTH, R. N. A small round virus associated with enteritis in turkey poult. **Avian Diseases**, v. 34, p. 762-764, 1990.

SCHULTZ-CHERRY, S.; KAPCZYNSKI, D. R.; SIMMONS, U. N.; KOCI, M. D.; BRWON, C.; BARNES, H. J. Identifying agent (s) associated with poult enteritis mortality syndrome: importance of the thymus. **Avian Diseases**, v. 44, p. 256-265, 2000.

SELLERS, S. H.; KOCI, M. D.; LINNEMAUN, E.; KELLEY, L.; SCHULTZ-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.

SILVA, S. E. L.; BONETTI, A. M.; PETROCELLI, A. T. M.; FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; CARDOSO T. C. Detection of turkey astrovirus in young poult affected with poult enteritis complex in Brazil. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 6, p. 629-63, 2008.

SILVA, S. E. L.; BONETTI, A. M.; PETROCELLI, A. T. M.; FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; CARDOSO, T. C. Epidemiological aspects of Astrovirus and Coronavirus in poult in the south eastern region of Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 40, p. 248-253, 2009.

STEPHENSON, C. B., CASEBOLT, D. B.; GANGOPADHYAY, N. N. Phylogenetic analysis of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. **Virus Research**, v. 60, n. 2, p. 181-189, 1999.

TANG, Y.; MURGIA, M. V.; SAIF, Y. M. Molecular characterization of the capsid gene of two serotypes of Turkey Astroviruses. **Avian Diseases**, v. 49, p. 514-519, 2005.

TANG, Y.; MURGIA, M. V.; WARD, L.; SAIF, Y. M. Pathogenicity of turkey astroviruses in turkey embryos and poults. **Avian Diseases**, v. 50, p. 526-531, 2006.

TANG, Y., SAIF, M. Antigenicity of two Turkey Astrovirus isolates. **Avian Diseases**, v. 48, p. 896-901, 2004.

TANG, Y.; WANG, Q.; SAIF, Y. M. Development of a ssRNA internal control template reagent for a multiplex RT-PCR to detect turkey astroviruses. **Journal Virological Methods**, v. 126, p. 81-86, 2005b.

TEIXEIRA, M. C. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FERRARI, H. F.; MENDES, A. R.; CARDOSO, T. C. Detection of Turkey Coronavirus in commercial turkey poults in Brazil. **Avian Pathology**, v. 36, p. 29-33, 2007.

THOUVENELLE, M. L.; HAYNES, J. S.; REYNOLDS, D. L. Astrovirus infection in hatchling turkeys: histologic, morphometric and ultrastructural findings. **Avian Diseases**, v. 39, p. 328-336, 1995.

WOOLCOCK, P. R.; SHIVAPRASAD, H. L. Electronic microscopic identification of virus associated with poult enteritis in turkey grown in California 1993-2003. **Avian Diseases**, v. 52, n. 2, p. 209-13, 2008.

CAPÍTULO 2

RT-PCR *in situ* hibridização na detecção da co-infecção pelo Coronavírus grupo 3 (TCoV) e Astrovírus (TAstV-2) em perus experimentalmente infectados

Ana C.G. Rosa¹, Raphael M. Vicente¹, Deriane E. Gomes¹, Alexandre L. Andrade², Maria C. Rui Luvizotto² Tereza C. Cardoso^{1,*}

- 1- UNESP- Universidade do Estado de São Paulo, Departamento DAPSA, Curso Medicina Veterinária, Laboratório de Virologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil;
- 2- UNESP- Universidade do Estado de São Paulo, Departamento DCCRA, Curso Medicina Veterinária, Laboratório de Patologia, Araçatuba, São Paulo, Brasil;

RESUMO

O presente estudo descreve o desenvolvimento e a aplicação da reação de transcrição reversa *in situ* em cadeia da polimerase (RT-PCR *in situ*), para detectar a co-infecção experimental de perus de 1-dia de idade com Coronavirus (TCoV) e Astrovirus (TAstV-2) isolados de casos clínicos no Brasil. A primeira etapa da reação consistiu na preparação específica de sondas de DNA biotinizadas homólogas ao gene da polimerase viral do TAstV-2 e da região 3'UTR do TCoV. Foram utilizados cortes histológicos de intestino correspondendo às regiões do íleo, junção íleo-ceco e ceco para avaliar a reação de RT-PCR *in situ*. Para permeabilização tecidual uma digestão foi aplicada com 10 µg/µl proteinase K por 30 min. Na etapa de hibridização, as sondas de DNA homólogo às regiões genômicas virais ligadas à biotina foram diluídas na concentração de 2µg/µl na solução de hibridização e incubadas overnight à 42°C. Em seguida, uma diluição ótima do anticorpo monoclonal anti-biotina acoplado a fosfatase alcalina e a peroxidase foram aplicados, para TAstV-2 e TCoV, respectivamente. O substratos diaminobenzidina 3,3 (DAB) e FastRed ® foram utilizados para identificar a hibridização das regiões homólogas correspondentes ao TCoV e TAstV-2, respectivamente. A reação positiva foi visualizada por deposição de pigmento vermelho (TAstV-2) e marrom acastanhado (TCoV). Em relação à localização dos genes virais amplificados, foram confirmados nas células da base (células calciformes) e ao longo das vilosidades intestinais principalmente no citoplasma dos enterócitos de forma difusa para ambos os vírus. Marcações positivas também foram evidenciadas na submucosa próximas às regiões com intensa congestão vascular. Em conclusão, a técnica de RT-PCR *in situ* padronizada no presente estudo demonstrou capacidade de detectar RNA viral promovendo uma desejável associação entre o diagnóstico morfológico e molecular a ser utilizado na medicina veterinária.

Palavras-chave: Perus, enterite viral, diagnóstico, PEMS.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, Turkey Coronavírus (TCoV) e Turkey Astrovírus (TastV) foram descritos recentemente pela primeira vez, afetando aves comerciais suspeitas de sofrerem de PEMS Poults Enteritis and Mortality Syndrome (Teixeira et al., 2007; Silva et al., 2008).

As partículas virais dos coronavírus grupo III são envelopadas, possuindo como genoma uma fita de RNA simples, não segmentada com sentido positivo, com morfologia normalmente caracterizada de pleomórficos quando observados à microscopia eletrônica de transmissão. O diâmetro da partícula viral varia entre 50 a 150 nm. O virion possui um envelope formado por uma bi-camada lipídica com projeções denominadas glicoproteínas S (90-180 kDa). As proteínas estruturais compreendem a matrix viral (M), glicoproteína, hemaglutinina estearase (HE – 120-140 kilodaltons [kDa]), com aparência morfológica de coroa solar (do latim corona). As três maiores proteínas estruturais da partícula viral incluem a M (20-35 kDa) e a proteína do nucleocapsídeo (N – 50-60 kDa) (Guy et al., 1997).

Outro agente infeccioso, envolvido nos quadros de enterite em perus, agravando os sintomas da PEMS, é o Astrovírus dos perus (TAstV-Turkey Astrovirus). Este agente viral foi primeiramente identificado em 1980, em casos clínicos de amostras fecais de perus com diarreia (Guy et al., 1997). Estudos experimentais demonstram que os Astrovírus são considerados um dos principais agentes, também quando associado aos TCoV nos casos de PEMS nos USA (Koci et al., 2002). TastV são partículas não envelopadas com RNA de sentido positivo e fita simples 6.8 a 7.9 Kb de comprimento com a terminação 3' poliadenilada. Na região adjacente a esta região poly (A) cerca de 110 nucleotídeos dos astrovírus humanos (HastV) são altamente conservados.

Métodos atuais para descrição desses patógenos em casos clínicos incluem: microscopia eletrônica de transmissão (MET), imunohistoquímica (IHQ), imuno-MET,

ELISA de captura, imunofluorescência, transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), isolamento viral (VI) (Breslin et al. 2000; Koci et al., 2000; Barnes et al., 2003; Spackman et al., 2005; Cardoso et al., 2008).

Diante de todo exposto, face aos escassos trabalhos existentes com TCoV e TstV-2 no Brasil, aliado ao crescimento acentuado da produção de perus no mercado nacional, com destaque no mercado mundial, o presente estudo investigou a detecção da co-infecção de TCoV e TstV-2 em perus, pela técnica de RT-PCR in situ hibridização, em cortes histológicos da porção do íleo, junção íleo-cecal e ceco.

2. MATERIAIS E MÈTODOS

2.1. Procedimentos gerais

Aves de 1-dia de idade foram mantidas e infectadas com procedimentos descritos anteriormente (Gomes et al., 2009). Fragmentos de intestinos (íleo, junção íleo-cecal e ceco) foram fixados em formol tamponado (pH 7,2) a 10% e submetidos a histotécnica padrão de rotina. Cortes histológicos com espessura de 3-4µm foram submetidos a coloração de rotina HE e analisadas ao microscópio óptico Zeiss®, modelo AxioImage A.1. As lâminas preparadas para a avaliação histopatológica descrita no item anterior foram submetidas ao processo de desparafinização, re-hidratação e lavagem com solução tamponada de fosfato PBS 7,4.

2.2. Reação de RT-PCR e produção das sondas biotiniladas

Todas as reações de transcrição reversa e reação de PCR foram realizadas segundo preconiza Teixeira et al. (2007). Para cada reação foram utilizados 5µL de RNA para a transcrição reversa com o uso das enzimas Superscript® III e Thermoscript®. As reações de

PCR foram realizadas seguindo as recomendações do Kit TaqPlatinum High Fidelity: 94°C por 1 min, 48°C por 1 min e 72°C por 2 min, durante 35 ciclos repetidos em um termociclador marca Eppendorf®, modelo Mastercycler. Os produtos foram visualizados por eletroforese em 1,5% agarose, com 0,5µg/ml de brometo de etídeo, detectados e documentados pelo sistema.

2.3. Reação de RT-PCR in situ

A técnica de RT-PCR in situ foi realizada em um termociclador Eppendorf®, modelo Mastercycler com bloco intercambiável para adaptação de lâminas de histopatologia. Primeiramente, as lâminas foram desparafinizadas por banhos consecutivos em soluções de xylol, e re-hidratadas com séries de álcool até o início da RT e PCR. O protocolo utilizado foi o descrito por Manohar et al. (2007) para o vírus rábico. Uma digestão proteolítica inicial com 10 µg/ml de proteinase K por 30 min foi realizada no intuito de favorecer a disponibilidade das seqüências de RNA para a reação. A reação foi interrompida com tampão Tris-HCl pH 7,4, 6mM de MgCl e 2mM de CaCl e aquecimento 95°C por 5min. A reação de RT-PCR foi conduzida em duas etapas. Para tanto, as lâminas foram recobertas com a mistura: 5x First strand Mix, 1µl de enzima (Superscript III e/ou ThermoScript) 1µl de dNTP mix, 1µl oligodT20, 8µl de RNA, 1µl DTT em um volume final 12µl. As lâminas foram recobertas com uma lamínula e deixadas no termociclador (Mastercycler® da Eppendorf) por 45 min 55°C com uma etapa a 95°C por 5min para interromper a atividade de RT. A reação de PCR foi conduzida nas seguintes condições: 1 X Reaction Mix com a Taq Polimerase Platinum High Fidelity 2,5UI e os primers da região 3UTR (+41 e -11), sendo o anti-sense acoplado a biotina. As concentrações foram: 8µl do cDNA, 1µl de cada primer, 1µl Taq Polimerase High Fidelity Para evitar evaporação as lâminas foram recobertas com lamínulas e seladas com selante

apropriado (silicone). Para evitar a atividade de peroxidase endógena foi utilizado o bloqueio de todas as lâminas com peróxido de hidrogênio 3% em álcool metílico. Para efeito de controle negativo, foram utilizadas cortes histológicos dos órgãos correspondentes, obtidas de embriões de perus sadios. A interpretação dos resultados foi realizada para determinar a marcação do RNA viral nas células infectadas. Esta etapa constituiu de hibridização das seqüências amplificada. Nesse sentido, os produtos da reação de RT-PCR de tamanho 250pb e 606pb correspondem as sondas biotiniladas para TCoV e TAstV-2, respectivamente. A construção dos produtos de RT-PCR biotinilados foi realizada pela extração de RNA viral com o KIT PureLink® viral RNA/DNA (Invitrogen™), e a amplificação pela técnica de RT-PCR com o KIT One-Step Superscript III/platinum Taq Polymerase High Fidelity (Invitrogen™). As condições foram as mesmas já descritas por Teixeira et al. (2007) e Silva et al. (2008).

2.4. Reação de hibridização

A reação de hibridização iniciou com desparafinização e re-hidratação e lavagens dos cortes histológicos, seguidas pelo aquecimento dos produtos de RT-PCR *in situ* (sonda) a 98°C por 8 min, mantidos em 4°C diluídos na concentração de 2µg/µl em uma solução de hibridização (50% de formamida, 5% soro albumina bovina, 0,02% de SDS e solução de citrato de sódio 5X – SSC). Após esta etapa, foram adicionados aos cortes histológicos, solução de hibridização, e aquecidos a mesma temperatura e tempo. Em uma câmara úmida, foram acondicionados os cortes histológicos recobertos com produtos biotinilados por 18 horas, selados com parafilme. Transcorrido o período de incubação, os parafilmes foram removidos e as lâminas lavadas em solução de hibridização sem SDS e com valores decrescentes

de solução de citrato de sódio: 0,1X SSC (solução citrato de sódio) (D) e 1X SSC (C), aquecidas em banho maria 56 °C por 15 minutos cada. Após essa etapa, os cortes foram re-fixados com paraformaldeído 4% por 20 minutos. O sinal foi detectado incubando-se as lâminas com peroxidase-acoplado a estreptavidina para TCoV e fosfatase alcalina acoplada a estreptavidina para o TAstV-2 (Sigma-Aldrich®) em PBS diluído 1:200, sendo respectivamente coradas com DAB (TCoV) e FastRed™ (TAstV-2) e contra coradas com hematoxilina Meyer e Harris respectivamente. A visualização e documentação das lâminas foram realizadas pelo microscópio Zeiss®, modelo AxionImage A.1 e Software Zeiss®, modelo AxioVision 4.7.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados referem-se à infecção experimental de perus jovens com o TCoV (Teixeira et al., 2007) e Astrovírus tipo 2 (TAstV-2) isolados no Brasil (Silva et al., 2008; 2009). As lesões microscópicas da PEMS foram caracterizadas por achatamento, vacuolização e destacamento das vilosidades; alteração na distância entre o ápice das vilosidades e a cripta, descamação dos enterócitos. Alterações como produção de muco, infiltrado inflamatório, desintegração do tecido conjuntivo e desorganização das vilosidades para ambos os vírus foi visualizada. Em relação à reação de RT-PCR *in situ* associada à hibridização, a localização do gene correspondente no RNA viral, foi confirmada nas células da base, ao longo das vilosidades e nas células em descamação para TCoV e TAstV-2, respectivamente. A reação positiva foi observada com deposição de pigmento vermelho (Fig. 1) e marrom acastanhado (Fig. 2), no citoplasma dos

enterócitos do epitélio intestinal na submucosa e próxima às regiões de descamação celular.

No presente estudo foi descrito, pela primeira vez, a distribuição de TAstV-2 e TCoV em porções do intestino de perus experimentalmente infectados com o uso da técnica de RT-PCR *in situ* hibridização. Na detecção do gene da polimerase viral do TAstV-2 e da região 3'UTR do TCoV, em relação a imunomarcação, as regiões do íleo, íleo-cecal, ceco não apresentaram diferença entre si. Vale ressaltar que, a técnica RT-PCR *in situ* tem sido utilizada no diagnóstico de outras enfermidades semelhantes, como a doença infecciosa da bursa de Fabricius (Cardoso et al., 2008b). Ademais, a grande vantagem da utilização desta metodologia foi a associação entre as lesões microscópicas com a marcação RNA viral. Entretanto, o grande obstáculo encontrado foi o processo de digestão tecidual. Os tecidos de perus jovens demonstraram maior susceptibilidade à digestão com a proteinase K, ocasionando a destruição do tecido conjuntivo com destacamento dos cortes das lâminas histológicas. Dessa forma, foram testadas diferentes concentrações, até obter a melhor condição para uso (resultados não apresentados).

As regiões genômicas, 3'UTR do TCoV (Cavanagh et al., 2001) e o gene da polimerase viral do TAstV-2 (Breslin et al., 1999) têm sido descritas como eficientes para o diagnóstico veterinário pela reação de RT-PCR convencional. O pré-tratamento dos tecidos antes da realização da técnica com proteinase K foi suficiente para promover a permeabilização dos componentes, como enzimas oligonucleotídeos e etc. Essa enzima já foi descrita em outros estudos com o mesmo propósito (Praveena et al., 2007; Cardoso et al., 2008b). Existem vários estudos utilizando a digestão enzimática tanto na imunistoquímica, quanto na extração de

ácidos nucleicos, em substituição ao aquecimento (Teixeira et al., 2007; Cardoso et al., 2008).

Em vários estudos anteriores, tanto as lesões microscópicas como as manifestações clínicas da co-infecção pelos dois vírus (TCoV e TAsTV-2) não diferem dos resultados obtidos na presente investigação. (Ismail et al., 2000; Barnes et al., 2000; Behling-Kelly et al., 2002). Por outro lado, infecções naturais por TCoV em perus, leva a replicação do vírus na região apical das vilosidades intestinais, causando má absorção, má digestão, diarreia e mudança do ambiente intestinal. Em contraste, TAsTV-2 replica na porção basal de vilosidades e, mais raramente, nas criptas, causando diarreia osmótica (Behling-Kelly et al., 2002) Além disso, as infecções por estes vírus fazem o trato digestivo suscetível a infecções secundárias por bactérias como: *Salmonella sp*, *Escherichia coli*, acarretando um agravamento da infecção, podendo levar a altos índices de mortalidade (Barnes et al., 2000; Shultz-Cherry et al., 2000; Pantin-Jackwood et al., 2007; Jindal et al., 2009a; Jindal et al., 2009b).

Resultados similares são descritos utilizando métodos moleculares, imunofluorescência, microscopia eletrônica e método de HE convencional, contudo nenhum descreve a técnica de RT-PCR *in situ* reportado pela presente investigação (Teixeira et al., 2007; Pantin-Jackwood et al., 2008; Jindal et al., 2009a; Jindal et al., 2009b). Em outros estudos, o TAsTV-2 têm sido descrito como responsável por promover alterações morfológicas em órgãos linfóides, como timo e bursa de Fabrícus, entretanto no presente estudo não foram analisados estes tecidos (Thouvenelle et al., 1995; Shultz-Cherry et al., 2000;).

É importante salientar que a técnica de PCR *in situ* tem como característica principal, detectar o RNA e/ou DNA viral em células e tecidos (Nuovo, 2008). Dessa

forma, existem três itens que favorecem a sua aplicação, tais como: associação com a técnica de PCR para a localização intracelular *in situ* hibridização, fornecer informações relativas à distribuição e localização do genoma viral e determinar o número de células infectadas, mesmo que em pequenas quantidades (Praveena et al., 2007).

Em resumo, RT-PCR *in situ*, associada à etapa de hibridização, pode aumentar a sensibilidade e a especificidade da detecção de pequenas quantidades de material genético viral, sem, entretanto, interferir na arquitetura tecidual. Nesse sentido, a técnica RT-PCR *in situ* pode ser aplicada para detectar a presença de TCoV e TAsV-2 concomitantemente em cortes histológicos de perus acometidos por PEMS.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP processo [2008/09945-0](#)) e CNPq pelo auxílio concedido.

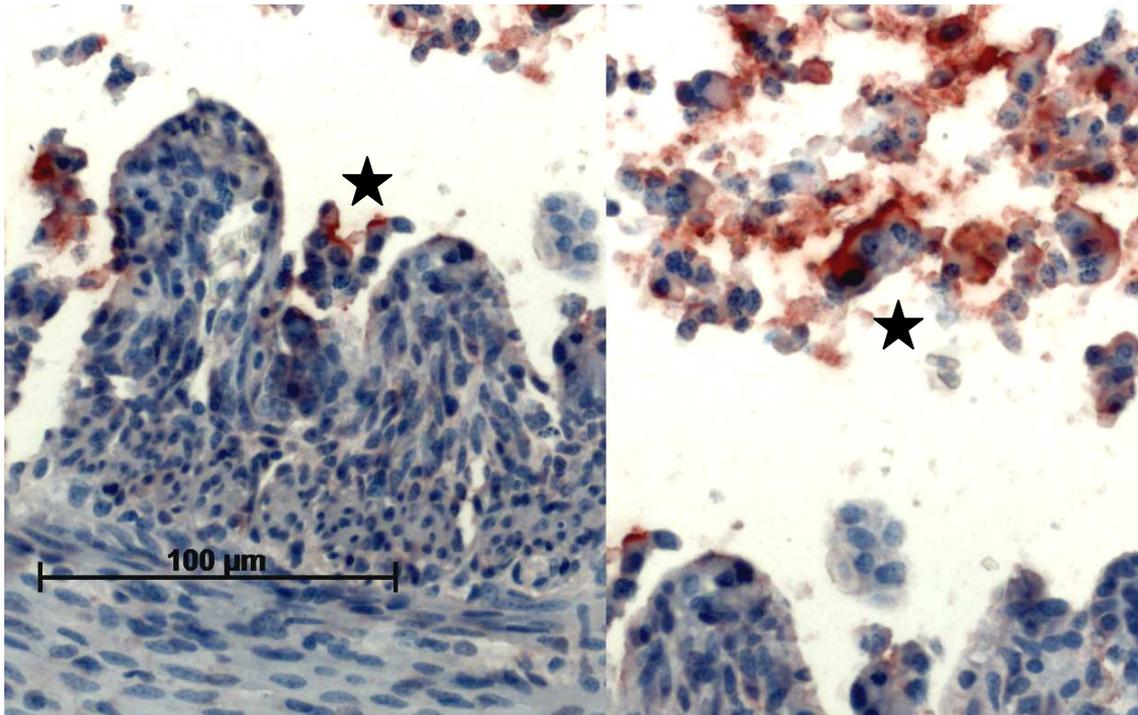


Figura 1. Fotomicrografia da RT-PCR *in situ* hibridização de secções do intestino de perus infectados revelando marcação positiva com deposição de pigmento vermelho (TAsV-2) no citoplasma dos enterócitos (setas) das células em descamação presentes na superfície das vilosidades e próximo as células caliciformes da região da junção-íleo-cecal e ceco. Coloração com substrado FastRed contra corados com hematoxilina Mayer's. obj 40x.

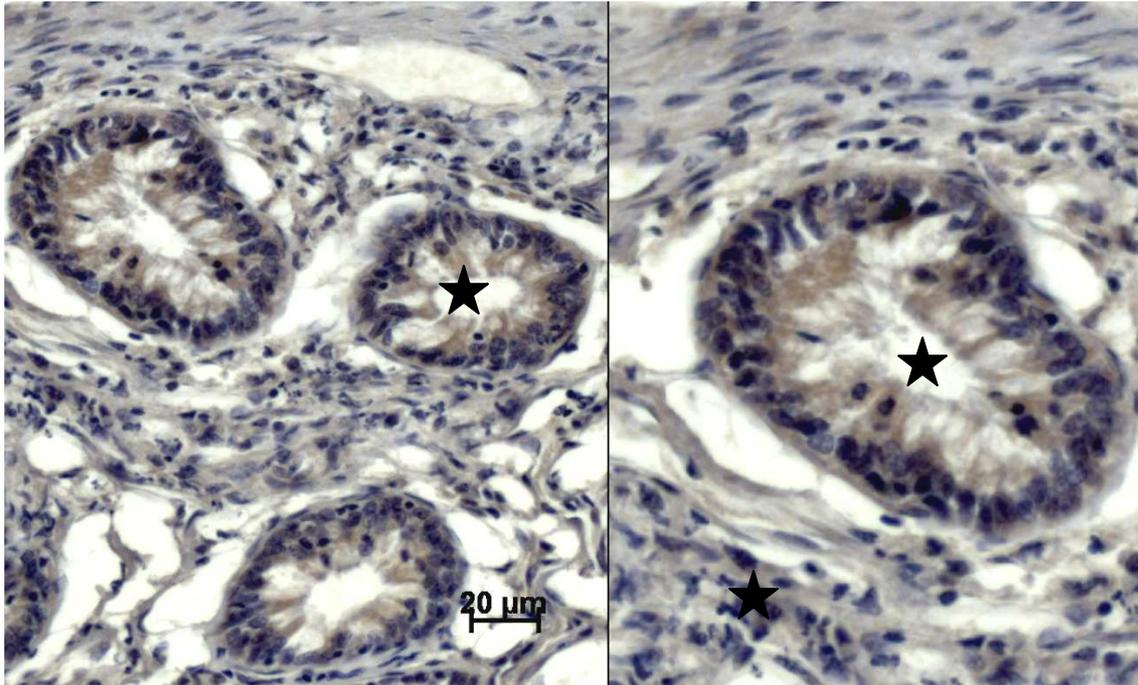


Figura 2. Fotomicrografia RT-PCR *in situ* hibridização das secções sagitais do intestino de perus infectados revelando marcação positiva com deposição de pigmento marrom (TCoV), nos enterócitos presentes na superfície das vilosidades e na submucosa (asteriscos) da região da junção-íleo cecal. Coloração com substrado DAB e contra corados com hematoxilina Harri's. obj 40x.

4. REFERÊNCIAS

- Adzhar A., Shaw K., Britton P. & Cavanagh D. 1996. Universal oligonucleotides for the detection of infectious bronchitis virus by the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 25, 817-836.
- Barnes H.J., Guy J.S. & Vailancourt J. P. 2000. Poultry enteritis complex. *Rev. Sci.* 19: 565-588.
- Behling-Kelly E., Shultz-Cherry S., Koci M., Larsen D. & Brown C. 2002. Localization of Astrovirus in experimentally infected turkey as determined by *in situ* hybridization. *Vet. Pathol.* 39:595-598.

- Breslin J.J., Smith L.G., Fuller F.J & Guy J.S 1999. Sequence analysis of the turkey coronavirus nucleocapsid gene and 3' untranslated region Identifies the virus as a close relative of infectious bronchitis virus. *Virus Res.* 65:187-198.
- Cardoso T.C., Castanheira T.L.L., Teixeira M.C.B., Rosa A.C.G., Hirata K.Y., Astolphi R.D. & Luvizotto M.C.R. 2008a. Validation of an immunohistochemistry assay to detect turkey coronavirus: a rapid and simple screening tool for limited resources settings. *Poultry Sci.* 87:1347-1352.
- Cardoso T.C., Rosa A.C.G., Astolphi R.D., Vicente R.M., Novais J.B., Hirata K.Y.& Luvizotto M.C.R. 2008b. Direct detection of infectious bursal diases virus from clinical samples by in situ reverse transcriptase-linked polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 37:457-461.
- Capua I., Minta Z., Karpinska E., Mawditt K., Britton P., Cavanagh D., & Gough, R.E. 1999. Co-circulation of four types of infectious bronchitis virus (793/B, 624/I, B1648 and Massachusetts). *Avian Pathol.* 28:587-592.
- Cattoli G., Battisti C De., Toffan A., Salviato A., Lavazza A., Ceriulli M. & Capua I. 2006. Co-circulation of distinct lineages of astroviruses in turkey and guinea fowl. *Arch. Virol.* 152:595-602.
- Cavanagh D. & Naqi A.S. 1997a. Infectious bronchitis. In: C.W.B.B.W. Calnek, HJ. Barnes Lr Mcdougald & Ym Saif (Eds). *Diseases of Poultry*, 10th Edn. Pp 511-526 Ames, IA: Iowa State University Press.
- Cavanagh D. & Davis P.J. 1998. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes. *J. Gen. Virol.* 69:621-629.

- Cavanagh D. K., Mawditt K., Shaw P. Britton & Naylor C. 1997b. Towards the routine application of nucleic acid technology for avian disease diagnosis. *Acta. Vet. Hung.*45:281-298 .
- Cavanagh D., Mawditt K., Welchman D De B, Britton P. & Gough R.E. 2002. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus Colchicus*) are genetically closely related to Coronavirus of domestic fowl (infectious bronchitis virus) and turkey. *Avian Pathol.* 31:81-93.
- Culver F., Dziva F., Cavanagh D., Stevens M.P. 2006. Poults enteritis and mortality syndrome in turkeys in Great Britain. *Vet. Rec.* 159:209-210.
- Guy, J.S. 2000. Turkey Coronavirus is more closely related to avian infectious bronchitis virus than to mammalian coronaviruses. *Avian Pathol.* 29:206-212.
- Guy J.S., Barnes J., Smith L.G. & Breslin J. 1997. Antigenic characterization of a Turkey Coronavirus identified in poult enteritis-and mortality syndrome-affected turkey. *Avian Dis.* 41:583-590.
- Guy J.S., Miles A.M., Smith L., Fuller F.J. & Schultz-Cherry S. 2004. Antigenic and genomic characterization of Turkey enterovirus-like virus (North Carolina, 1988 Isolate): Identification of the virus as Turkey Astrovirus 2. *Avian Dis.* 48:206-211.
- Ismail M.M., Cho K.O., Hasoksuz M., Saif L.I. & Saif YM. 2001. Antigenic and genomic relatedness of Turkey origin Coronavirus, Bovine Coronavirus and Infectious Bronquitis Virus of Chickens. *Avian Dis.* 45:978-84.
- Jindal .N., Patanayak A.F., Ziegler A.F., Lago A. & Goyal S.M. 2009a. Experimental reproduction of poult enteritis syndrome: Clinical findings, growth response, and microbiology.
- Jindal .N., Patanayak A.F., Ziegler A.F., Lago A. & Goyal S.M. 2009b. A retrospective study on poult enteritis syndrome in Minesota. *Avian Dis.* 53:268-275.

- Koci M.D., Kelley L.A., Larsen D. & Schultz-Cherry S. 2004. Astrovirus-induced synthesis of nitric oxide contributes to virus control during infection. *J. Virol*, 78:1564-1574.
- Koci M.D., Moser L.A., Kelley L.A., Larsen. D., Brown C.C. & Schultz-Cherry. 2003. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. *J. Virol*. 77:11798-11808.
- Koci, M.D., & Schultz-Cherry, S. 2002. Avian Astrviruses. *Avian Pathol*. 31:213-227.
- Koci M.D., Seal B.S. & Schultz-Cherry S. 2000. Development of an RT-PCR diagnostic test for an avian astrovirus. *Journal of Virological Methods*. 90:79-83.
- Lin T.L., Loa C.C. & Wu C.C. 2002. Existence of gene 5 indicates close genomic relationship of Turkey Coronavirus to Infectious Bronchitis virus. *Acta Virol*. 46: 107-116.
- Loa CC., Lin T.L., Wu C.C., Bryan T.A., Thacker H.L., Hooper T. & Schrader, D. 2004. Expression and purification of Turkey Coronavirus nucleocapsid protein in *Escherichia Coli*. *J. Virol. Meth*. 116 :161-167.
- Matthew D.K., Seal B.S. & Cherry-Schultz, S. 2000. Development of an RT-PCR diagnostic test for avian Astrovirus. *J. Virol. Meth*. 90:79-83.
- McNulty M.S., Curran W.L. & McFerran J.B. 1980. Detection of astroviruses in turkey faeces by direct electron microscopy. *Vet Rec*. 106:561.
- Nicol A.F. & Nuovo G.J. 2005. RT in situ PCR: Protocols and Applications. *Meth. Microbiol*. 34:240-253.
- Patin-Jackwood M.J., Spackman E. & Woolcock P.R. 2006a . Phylogenetic analysis of turkey astroviruses reveals evidence of recombination. *Virus Genes*. 32:187-192.

- Patin-Jackwood M.J., Spackman E. & Woolcock P.R. 2006b. Molecular characterization and typing of chicken and turkey Astroviruses circulating in the United States: Implications for Diagnostics. *Avian Dis.* 50: 397-404.
- Patin-Jackwood M.J., Spackman E., Day J.M. & Rives D. 2007. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. *Avian Dis.* 51:149-164.
- Patin-Jackwood M.J., Spackman E. & Day M.J. 2008. Pathogenesis of type 2 astroviruses with variant capsid genes in 2-day-old specific pathogen free poult. *Avian Pathol.* 37:193-201.
- Praveena P.E., Jayakumar R., Balachandran C., Thirumurugan, G., Dhinakar, R. & Manohar, BM. 2007. Detection of rabies virus genes by in situ polymerase chain reaction. *Vet. Res. Commu.*31(6):775-81.
- Saif L.J., Saif Y.M. & Thail K.W. 1985. Enteric viruses in diarrheic turkey poult. *Avian Dis.* 29:798-811.
- Saif Y.M., Saif L.J., Hofarce C.L., Hayhow C., Swayne D.E. & Dearth, R.N. 1990. A small round virus associated with enteritis in turkey poult. *Avian Dis.* 34:762-764.
- Silva S.E.L., Bonetti A.M., Petrocelli A.T.M., Ferrari H.F., Luvizotto M.C.R. & Cardoso T.C. 2009. Epidemiological aspects of Astrovirus and Coronavirus in poult in the south eastern region of Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 40:248-253.
- Silva S.E.L., Bonetti A.M., Petrocelli A.T.M., Ferrari H.F., Luvizotto M.C.R. & Cardoso T.C. 2008. Detection of Turkey Astrovirus in young poult affected with poult enteritis complex in Brazil. *J. Vet. Med. Sci.* 70:629-631.
- Schultz-Cherry S., Kapczynski D.R., Simmons U.N., Koci M.D., Brwon C. & Barnes H.J. 2000. Identifying agent (s) associated with poult enteritis mortality syndrome: importance of the thymus. *Avian Dis.* 44:256-265.

- Sellers S.H., Koci M.D., Linnemaun E., Kelley L. & Schultz-Cherry S. 2004. Development of a multiplex reverse transcription-polimerase chain reaction diagnostic test specific for Turkey Astrovirus and Coronavirus. *Avian Dis.* 48:531-539.
- Tang Y., Murgia M.V. & Saif Y.M. 2005. Molecular characterization of the capsid gene of two serotypes of Turkey Astroviruses. *Avian Dis.* 49:514-519.
- Tang Y., Murgia M.V., Ward L. & Saif Y.M. 2006. Pathogenicity of turkey astroviruses in turkey embryos and poult. *Avian Dis.* 50: 526-531.
- Tang Y., & Saif M. 2004. Antigenicity of two turkey astrovirus isolates. *Avian Dis.* 48:896-901.
- Tang Y., Wang Q. & Saif Y.M. 2005b. Development of a ssRNA internal control template reagent for a multiplex RT-PCR to detect turkey astroviruses. *Journal of Virol Meth.* 126:81-86.
- Teixeira M.C.B, Luvizotto M.C.R., Ferrari H.F., Mendes A. R. & Cardoso T.C. 2007. Detection of turkey coronavirus in commercial turkey poult in Brazil. *Avian Pathol.* 36:29-33.
- Thouvenelle M.L., Haynes J.S. & Reynolds D.L. 1995. Astrovirus infection in hatchling turkeys: histologic, morphometric and ultrastructural findings. *Avian Dis.* 39:328-336.
- Villarreal L.Y.B., Assayag M.S., Brandão P.E., Bungler A.N.D., Astolfi-Ferreira C.S., Gomes C.R., Jones R.C. & Ferreira A.J.P. 2006. Identification of turkey astrovirus and turkey coronavirus in outbreak of poult enteritis and mortality Syndrome. *Braz. J. Poultry Sci.* 8:131-135.
- Yu M., Ismail M.M., Qureshi M.A., Dearth R.N., Barnes H.J. & Saif Y.M. 2000. Viral agents associated with poult enteritis and mortality syndrome: the role of a small round virus and a turkey coronavirus. *Avian Dis.* 44:297-304.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)