

Comunicação

[Communication]

Surto de diarreia em vacas de um rebanho leiteiro na região sul de Minas Gerais: detecção de coronavírus bovino nas fezes

[Outbreak of diarrhea in cows from a dairy herd in the southern region of Minas Gerais State: detection of bovine coronavirus in the feces]

P.S. Bezerra Jr¹, P.E. Brandão², S.P. Pavarini³, M.S. Varaschin¹, F. Wouters¹,
L.Y.B. Villarreal⁴, J.A. Jerez², G.M. Costa¹

¹Departamento de Medicina Veterinária - UFLA – Lavras, MG

²Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP – São Paulo, SP

³Aluno de pós-graduação - UFRGS – Porto Alegre, RS

⁴Intervet-Schering Plough – São Paulo, SP

Uma síndrome clínica afetando bovinos adultos, caracterizada por diarreia ou disenteria profusa, aguda, associada à drástica diminuição da produção de leite e graus variáveis de depressão, anorexia e sinais respiratórios, tem sido descrita em diversos países (Saif, 1990). A doença tem sido denominada disenteria de inverno, embora alguns surtos possam ocorrer também em estações quentes (Park et al., 2006). Em geral, sua morbidade é alta, mas a letalidade é baixa ou nula (Saif, 1990).

Desde a década de 70, vários trabalhos vêm apontando o envolvimento do coronavírus bovino nestes surtos (Van Kruiningen et al. 1987; Saif et al. 1991; Travén et al., 2001). No Brasil, a primeira detecção de coronavírus nas fezes de vacas adultas com diarreia foi relatada por Brandão et al. (2002) no Estado de São Paulo. Desde então, vários trabalhos têm ressaltado a importância do vírus em surtos de diarreia em bovinos adultos (Brandão et al., 2007a, b). Dados sobre a relevância do coronavírus em surtos de diarreia em bovinos adultos em outras regiões do país se fazem necessários. No presente trabalho foi realizada a pesquisa do coronavírus bovino pela técnica de *nested*-RT-PCR em amostras fecais de bovinos adultos em um surto de diarreia em Lavras, Minas Gerais, sendo pesquisados também outros agentes infecciosos. Os aspectos

epidemiológicos e clínicos deste surto foram apresentados.

Os dados clínicos e epidemiológicos do surto foram obtidos junto ao proprietário em visitas à propriedade onde ocorreu a enfermidade. Na primeira visita, durante a ocorrência do surto, foram coletadas fezes do reto de cinco vacas com sinais clínicos, que foram mantidas sob refrigeração até o envio aos laboratórios para exames bacteriológico, parasitológico e virológico. Além disso, amostras de sangue de três vacas com diarreia foram coletadas durante a primeira visita e 15 dias após para realização de sorologia pareada para diarreia viral bovina (BVD).

A bacteriologia constou principalmente da pesquisa de *Salmonella* sp, tendo sido empregada a metodologia de análise preconizada por Koneman et al. (2001). A avaliação parasitológica consistiu da determinação do número de ovos (OPG) e oocistos (OOPG) por grama de fezes, segundo a técnica descrita por Sloss et al. (1999). Amostras pareadas de soro foram encaminhadas ao laboratório de virologia para diagnóstico sorológico de BVD pela prova de soro-neutralização (Ridpath e Flores 2007).

O coronavírus bovino (BCoV) foi pesquisado nas amostras fecais por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) dirigida ao gene codificador

Recebido em 4 de novembro de 2008

Aceito em 23 de junho de 2009

E-mail: bezerraj@ufla.br

da RNA-polimerase RNA-dependente (Rd Rp) dos coronavírus, utilizando-se primers e condições de reação descritos por Stephensen et al. (1999) e Brandão (2004), com algumas modificações (Tab. 1).

As amostras fecais foram preparadas como suspensões a 50% em PBS 0,01M/BSA 0,1% pH 7,2 (PBS) e clarificadas a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C, tomando-se o sobrenadante como amostra. A transcrição reversa (síntese de c-DNA) foi realizada a 42°C/60' em um *mix* contendo 1 x *first strand buffer*¹, 1mM de cada dNTP, 10mM DTT, 1µM de cada *primer* 2Bp e 4Bm (Stephensen et al., 1999), 7µL de RNA extraído pelo método do trizol (Invitrogen) (de acordo com as instruções do fabricante e desnaturados a 95°C/5') e 200U de M-MLV *Reverse Transcriptase*¹ para uma reação final de 20µL. A seguir, 5µL de c-DNA assim obtido foram adicionados ao PCR *mix* (1 x PCR *buffer*¹, 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* (2Bp e 4Bm), 1,5mM MgCl₂, 25,25µL de água ultrapura e 1,25U Taq DNA polimerase para uma reação final de 50µL e submetidos a seis ciclos de 94°C/1', 40°C/2' e 72°C/1', 36 ciclos de 94°C/1', 50°C/1,5' e 72°C/1', seguidos por 72°C/10' para extensão final. A fase de *nested-PCR* foi realizada com 5µL do produto da primeira PCR assim obtido adicionados ao *mix* contendo 1 x PCR *buffer*¹, 0,2mM de cada dNTP, 0,5µM de cada *primer* CV2L e CV2U (Brandão, 2004), 1,5mM MgCl₂, 25,25µL de água ultrapura e 1,25U Taq DNA polimerase) e submetidos a 26 ciclos de 94°C/1', 54,8°C/1,5' e 72°C/1' seguidos por 72°C/10' para extensão final.

A amostra padrão Kakegawa de BCoV (Akashi et al., 1980) foi incluída como controle positivo, e o PBS como controle negativo; ainda, na reação *nested*, foi incluído um tubo com água ultrapura a cada três amostras, processado em conjunto com estas, com o intuito de se monitorarem contaminações por DNA amplificado. A seguir, 10µL do produto de *nested PCR* foram resolvidos em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo e observado em luz ultravioleta, considerando-se positivas as amostras que apresentaram banda de 136 pares de bases. Cada uma das fases (preparação das amostras e extração de RNA, transcrição reversa e PCR, *nested-PCR* e eletroforese) foi realizada em ambientes separados, visando evitar contaminações.

Rotavírus foram pesquisados por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (Herring et al., 1982). Suspensões fecais a 20% foram preparadas em tampão TRIS 0,01M/ CaCl₂ 0,0015M pH 7,3, centrifugando-se a 12000 x g/30', extraíndo-se o RNA do sobrenadante com fenol-clorofórmio, procedendo-se à eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo a 3,5%/7,5% e corando-se com nitrato de prata. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram padrão de migração das bandas de RNA similares aos apresentados pela amostra NCDV (Nebraska Calf Diarrhea Virus) de rotavírus (White et al., 1970) incluída como controle positivo. Ainda, como controle negativo, foi utilizado PBS.

Tabela 1. *Primers* utilizados para a detecção do gene codificador da RNA-polimerase RNA-dependente (Rd Rp) dos coronavírus

<i>Primer</i>	Sequência	Fragmento amplificado
4Bm	5' TCACAYTTWGGATARTCCCA 3'	251pb
2Bp	5' ACTCARWTRAATYTNAATAYGC 3'	
CV2U	5' TACTATGACTGGCAGAAATGTTTCA 3'	136pb
CV2L	5' AACATCTTTAATAAGGCGRCGTAA 3'	

O surto de diarreia ocorreu durante os meses de agosto e setembro de 2003, na comunidade Santa Cruz, distrito Três Barras, Município de Lavras,

MG. De um rebanho leiteiro de 10 vacas, sete adoeceram, duas delas em lactação. Inicialmente, as vacas apresentaram apatia, pelos arrepiados,

¹Invitrogen, Life Technologies - Carlsbat, EUA.

corrimento seroso nasolacrimal, redução do apetite e queda súbita na produção leiteira. As vacas em lactação apresentaram fezes pastosas a líquidas, esverdeadas com estrias de sangue, enquanto as demais tiveram diarreia mais branda, sem sangue. O quadro clínico nas vacas em lactação se estendeu por oito a 10 dias, enquanto nas vacas secas foi de seis a sete dias. Os animais se recuperaram sem tratamento. Antes da doença clínica, a produção média diária por vaca era de 20 litros, caindo para menos de dois litros. A produção só voltou a aumentar em torno de cinco dias após o fim da diarreia, contudo não atingindo os níveis anteriores (no máximo 10 litros/dia). O proprietário não observou doença clínica nos bezerros no período do surto, tendo relatado que durante os doze anos anteriores ao surto, não havia observado quadro clínico semelhante na propriedade. Segundo o proprietário, o rebanho não apresentou problemas de repetição de cio, abortos ou nascimento de bezerros fracos durante ou após o período do surto.

Todas as cinco amostras analisadas resultaram no fragmento esperado de 136pb após a PCR, evidenciando nelas a presença do BCoV. Nenhuma banda foi evidenciada nas reações referentes aos controles negativos e controles inseridos na fase de *nested*. As cinco amostras foram negativas para rotavírus em PAGE, e as análises bacteriológicas das fezes também foram negativas. As três vacas testadas não apresentaram soroconversão para BVD. A contagem de OPG de fezes variou de índices não detectáveis a 300 OPG, enquanto a contagem de OOPG foi negativa em todos os bovinos testados.

Os aspectos clínicos e epidemiológicos do surto são compatíveis com os descritos na disenteria de inverno (Saif, 1990). Os resultados dos exames laboratoriais, a exemplo do que tem sido descrito por diversos autores (Van Kruiningen et al., 1987; Saif et al., 1991; Travén et al., 2001; Brandão et al., 2002; 2007a, b), reforçam o envolvimento do coronavírus bovino no surto descrito. A técnica de reação em cadeia pela polimerase mostrou-se útil para o diagnóstico rápido da presença do coronavírus em amostras fecais de vacas com diarreia. Não foram detectadas coinfeções por rotavírus, vírus da diarreia viral bovina e salmonela. As contagens de ovos detectadas nas fezes de alguns animais não têm sido consideradas de significância clínica (Sloss et al., 1999).

Deve-se considerar, no diagnóstico diferencial, outras doenças não relacionadas ao coronavírus bovino que podem causar diarreia de curso abrupto e curto em bovinos adultos, como diarréia viral bovina, coccidiose, deficiência de cobre associada ao excesso de molibdênio e diarreia dietética (Radostits et al., 2000), assim como a possibilidade de ocorrerem coinfeções.

Os históricos de surtos similares sugerem que a doença pode ter um impacto importante na pecuária da região sul de Minas Gerais. Vários aspectos da cadeia epidemiológica e patogênese desta doença, tais como as fontes de infecção e vias de transmissão envolvidas, precisam de esclarecimento, o que demonstra a necessidade de pesquisas nestas áreas.

Palavras-chave: gado de leite, diarreia, disenteria de inverno, coronavírus

ABSTRACT

An outbreak of diarrhea in adult cattle from a dairy herd of Lavras county, MG, was described. From a herd of 10 cows, seven became ill. The diarrhea lasted six to 10 days, being more prolonged, intense, and with blood in lactating cows. Other signs included apathy, reduced appetite and milk production, and serous nasolacrimal discharge. Bovine coronavirus was detected in fecal samples from the five cattle tested by nested-RT-PCR.

Keywords: dairy cow, diarrhea, winter dysentery, coronavirus

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, H.; INABA, Y.; MIURA, Y. et al. Properties of a coronavirus isolated from a cow with epizootic diarrhea. *Vet. Microbiol.*, v.5, p.265-276, 1980.

BRANDÃO, P.E. *Coronavírus bovino (BCoV): ocorrência, diversidade molecular e padronização de PCR para diagnóstico a partir de amostras fecais de bezerros com e sem diarréia criados em São Paulo e Minas Gerais, Brasil.* 2004. 79f. Tese

Surto de diarreia em vacas...

(Doutorado). - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BRANDÃO, P.E.; BIRGEL Jr., E.H.; GREGORI, F. et al. Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*, v.69, p.103-104, 2002.

BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F.; SFORSIN, A.J. et al. Winter dysentery in cows associated with bovine coronavirus. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.1074-1076, 2007a.

BRANDÃO, P.E.; VILLARREAL, L.Y.B.; GREGORI, F. et al. On the etiology of an outbreak of winter dysentery in dairy cows in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.*, v.27, p.398-402, 2007b.

HERRING, A.J.; INGLIS, N.F.; OJEH, C.K. et al. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.*, v.16, p.473-477, 1982.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. et al. *Diagnóstico microbiológico*. 5.ed. São Paulo: MEDSI, 2001. 1465p.

PARK, S.J.; JEONG, C.; YOON, S.S. et al. Detection and characterization of bovine coronaviruses in fecal specimens of adult cattle with diarrhea during the warmer seasons. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, p.3178-3188, 2006.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. et al. *Veterinary medicine*. 9.ed. London: WB Saunders, 2000. 1877p.

RIDPATH, J.F.; FLORES, E.F. Flaviviridae. In: FLORES, E.F. (Ed). *Virologia veterinária*. Santa Maria: Editora UFSM, 2007. p.565-591.

SAIF, L.J. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? *Cornell Vet.*, v.80, p.303-311, 1990.

SAIF, L.J.; BROCK, K.V.; REDMAN, D.R. et al. Winter dysentery in dairy herds: electron microscopic and serological evidence for an association with coronavirus infection. *Vet. Rec.*, v.128, p.447-449, 1991.

SLOSS, M.W.; ZAJAC, A.M.; KEMP, R.L. *Parasitologia clínica veterinária*. 6.ed. São Paulo: Manole, 1999. 198p.

STEPHENSEN, 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 Res.*, v.60, p.181-189, 1999.

TRAVÉN, M.; NÄSLUND, K.; LINDE, N. et al. Experimental reproduction of winter dysentery in lactating cows using BCV - comparison with BCV infection in milk-fed calves. *Vet. Microbiol.*, v.81, p.127-151, 2001.

VAN KRUININGEN, H.J.; KHAIRALLAH, L.H.; SASSEVILLE, V.G. et al. Calfhood coronavirus enterocolitis: a clue to the etiology of winter dysentery. *Vet. Pathol.*, v.24, p.564-567, 1987.

WHITE, R.G.; MEBUS, C.A.; TWIEHAUS, M.J. Incidence of herds infected with a Neonatal Calf Diarrhea Virus (NCDV). *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v.65, p.487-490, 1970.