

Detecção de coronavírus em amostras de fezes diarreicas de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Estado de São Paulo¹

Rodolfo S. Rossi², Natália C. Gaeta², Fabio Gregori³ e Lilian Gregory^{2*}

ABSTRACT.- Rossi R.S., Gaeta N.C., Gregori F. & Gregory L. 2017. [Detection of coronavirus in diarrhea samples from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) raised in the State of São Paulo, Brazil.] Detecção de coronavírus em amostras de fezes diarreicas de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Estado de São Paulo. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 37(8):802-804. Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Professor Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brazil. E-mail: lgregory@usp.br

Neonatal diarrhea can be a consequence of bacterial, endoparasite and viral infections. Although virus involved in diarrhea is frequently studied in cattle herds, there is lack of studies in Brazilian buffalo herds. The aim of this study was evaluate the presence of rotavirus and coronavirus in diarrhea samples of buffaloes (*Bubalus bubalis*) raised on eight farms in Pariquera-açu, Registro, Pirassununga, Dourado, São João da Boa Vista e Congonhas, State of São Paulo, Brazil. We collected 40 diarrhea samples from water buffalo calves. While coronavirus was detected using nested polymerase chain reaction, rotavirus was detected using Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) with silver stain. Rotavirus was not detected, while two samples (2/40, 5.0%) were positive for coronavirus. Although we did not detect rotavirus, a low percentage of coronavirus was observed; possible interference of these viruses in the development of diarrhea should not be discarded. Considering the lack of literature about diarrhea in water buffalo calves, particularly the one related with coronavirus, our results encourage new studies to enhance buffalo health in our country.

INDEX TERMS: Coronavirus, diarrhea, buffaloes, *Bubalus bubalis*, State of São Paulo, Brazil, virology, buiatrics.

RESUMO.- A diarreia neonatal pode ser consequência de infecções bacterianas, endoparasitárias e virais. Enquanto esses agentes virais são extensamente estudados nos rebanhos bovinos, faltam informações sobre a importância destes para os rebanhos bubalinos brasileiros. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de rotavírus e coronavírus em amostras de fezes diarreicas de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados em oito propriedades localizadas em Pariquera-açu, Registro, Pirassununga, Dourado,

São João da Boa Vista e Congonhas, Estado de São Paulo. Foram coletadas 40 amostras de fezes diarreicas de bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*). A detecção de coronavírus foi realizada pela nested-PCR, enquanto que a detecção de rotavírus foi realizada pela Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) com coloração com nitrato de prata. Enquanto rotavírus não foi identificado, duas amostras (2/40, 5,0%) foram positivas para coronavírus. Embora no presente trabalho tenha havido baixa detecção de coronavírus e a ausência de rotavírus nos rebanhos estudados, a possível interferência desses vírus no desenvolvimento dos quadros diarreicos não deve ser descartada. Considerando o escasso material encontrado na literatura a respeito da diarreia em bezerros búfalos, principalmente aquele relativo ao coronavírus, nossos resultados são um incentivo para que novos estudos sejam realizados para impulsionar o desenvolvimento da bubalinocultura em nosso país.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Coronavírus, búfaloes, *Bubalus bubalis*, São Paulo, virologia, diarreia, buiatria.

¹ Recebido em 18 de dezembro de 2015.

Aceito para publicação em 11 de novembro de 2016.

Pesquisa de iniciação científica com apoio FAPESP.

² Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Professor Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. E-mails: rodolfosrossi@gmail.com, natalia.gaeta@hotmail.com; *Autor para correspondência: lgregory@usp.br

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP, Av. Professor Orlando Marques de Paiva 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brasil. E-mail: fabiogregori@gmail.com

INTRODUÇÃO

A produtividade de rebanhos bovinos e bubalinos está intimamente relacionada ao sucesso na criação de bezerros. Dentre as principais causas de insucesso na criação bubalina e bovina, destaca-se a diarreia neonatal, responsável pelas maiores taxas de morbidade e mortalidades nestas criações (Cho & Yoon 2014).

A diarreia neonatal pode ser consequência de infecções bacterianas (*Escherichia coli* enterotoxigênica e *Salmonella* spp.); endoparasitárias (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp. e *Toxocara vitulorum*) e virais (rotavírus e coronavírus) (Brandão et al. 2007, Gregory et al. 2014).

Os Rotavírus pertencem à família Reoviridae e ao gênero *Rotavirus* (King et al. 2012) e dentre eles, o rotavírus bovino do grupo A (BoRVA) é considerado um dos principais agentes relacionados a diarreia neonatal bovina (Midgley et al. 2012). A técnica de gel de poliacrilamida (PAGE) é a comumente utilizada para a detecção destes vírus, já que é capaz de distinguir segmentos de RNA dupla-fita, componentes do genoma, pelo tamanho (Coura et al. 2015).

Os coronavírus bovinos (BCoV), por sua vez, pertencem à família *Coronaviridae* e ao o gênero Betacoronavírus (King et al. 2012). É frequentemente relatado como importante agente responsável por diarreia em bezerros de até um mês de vida (Stipp et al. 2009), bem como agente de disenteria de inverno em adultos (Saif 1990, Brandão et al. 2002, Bezerra Jr et al. 2009, Barrera Valle et al. 2014) e infecções respiratórias.

No Estado de São Paulo, Jerez et al. (2002) detectaram rotavírus em 14% dos bezerros estudados, utilizando PAGE como técnica diagnóstica. Utilizando semi nested-PCR e PAGE, Coura et al. (2015), detectaram coronavírus em 10,9% e rotavírus em 49,2% dos animais, respectivamente, com o rotavírus sendo único agente viral associado à diarreia dos bezerros estudados.

Enquanto esses agentes virais são extensamente estudados nos rebanhos bovinos, faltam informações sobre a importância destes para os rebanhos bubalinos brasileiros. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de rotavírus e coronavírus em amostras de fezes diarreicas de búfalos (*Bubalus bubalis*) criados no Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras. Foram coletadas 40 amostras de fezes diarreicas de bezerros búfalos (*Bubalus bubalis*), criados em oito propriedades localizadas nos municípios de Pariquera-açu, Registro, Pirassununga, Dourado, São João da Boa Vista e Congonhas, localizadas no estado de São Paulo, Brasil, com idade máxima de seis meses, através de massagem na ampola retal, acondicionadas em sacos plásticos devidamente identificados e refrigerados. Todos os animais com diarreia eram identificados e as amostras coletadas. No laboratório, cinco gramas de cada amostra foram acondicionadas em tubos plásticos e armazenadas a -80°C, para detecção de coronavírus e rotavírus.

Detecção de coronavírus. As amostras foram preparadas como suspensões a 50% (v/v) em água ultra-pura previamente tratada com dietilpirocarbonato a 0,1% e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C. Extraiu-se o RNA total do sobrenadante com o reagente TRIzol (Invitrogen®) e o cDNA foi sintetizado usando-

-se primers randômicos (Invitrogen®) e transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen®), todos de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para a primeira amplificação por PCR, os primers 4bm e 2Bp foram utilizados para a detecção de um segmento do gene *pol*, com 251pb (Stephensen et al. 1999). A segunda amplificação (*nested*-PCR) foi realizada com os primers CV2U e CV2L, os quais amplificam um segmento genômico interno ao segmento amplificado pelos primers 4Bm e 2Bp, gerando um produto de 136 pb, direcionado para os Betacoronavírus (Brandão et al. 2005), visualizado através de gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo a 0,5µg/mL.

Detecção de rotavírus. O estudo do rotavírus foi realizado por meio da técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE) e posterior coloração com nitrato de prata, como descrito por Herring et al. (1982).

RESULTADOS

Os resultados obtidos com o teste de eletroforese de RNA de rotavírus em gel de poliacrilamida para identificação de rotavírus nas fezes não revelaram amostras positivas. Quanto ao diagnóstico de coronavírus, duas amostras (2/40, 5,0%) resultaram positivas, apresentando bandas compatíveis tanto pela PCR e *nested*-PCR, sendo uma do município de Pariquera-Açu e a outra de São João da Boa Vista.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, não foram detectados animais positivos para rotavírus. Este resultado está em concordância com a descrição feita por Ribeiro et al. (2000), os quais não observaram amostras positivas utilizando a técnica PAGE em búfalos criados no Vale do Ribeira, Estado de São Paulo. Estudando a mesma região que Ribeiro et al. (2000), Rácz et al. (1992), identificaram rotavírus como agente causal em apenas 0,08% bezerros búfalos examinados. Por outro lado, o rotavírus é uma das principais causas de diarreia em búfalos em outros países como a Índia (Nataraju et al. 2009, Niture et al. 2011, Mondal et al. 2013). Segundo Ribeiro et al. (2000) alguns fatores como manejo, idade dos animais e estação do ano podem ser responsáveis pela baixa ocorrência de rotavírus nos rebanhos, o que explicaria a discrepância entre os resultados do presente trabalho e os relatados na literatura.

O presente trabalho é o primeiro no Brasil a pesquisar a presença de coronavírus em búfalos com diarreia. A falta de dados impede a comparação com outros trabalhos na área. Entretanto, na criação bovina brasileira, Jerez et al. (2002) e Brandão et al. (2007), no estado de São Paulo; Ferreira et al. (2009) e Coura et al. (2015), em Minas Gerais, relataram 39%, 22%, 8% e 67% de positividade, respectivamente, em bezerros, evidenciando a importância deste vírus nos casos de diarreia bovina no país. A coronavirose associada a diarreia de bovinos também teve sua importância descrita em outros países, como Itália (Decaro et al. 2010), Índia (Rai et al. 2011, Dash et al. 2012), Iraque (Al-Robaiee & Al-Farwachi 2013) e Argélia (Ammar et al. 2014).

CONCLUSÕES

Embora no presente trabalho tenha havido baixa detecção de coronavírus e a ausência de rotavírus nos rebanhos

estudados, a possível interferência desses vírus no desenvolvimento dos quadros diarreicos não deve ser descartada.

Considerando o escasso material encontrado na literatura a respeito da diarreia em bezerros búfalos, principalmente aquele relativo ao coronavírus, nossos resultados são um incentivo para que novos estudos sejam realizados para impulsionar o desenvolvimento da bubalinocultura em nosso país.

REFERÊNCIAS

- Al-Robaiee I.A. & Al-Farwachi M.I. 2013. Prevalence of rotaviral infection in diarrheic neonatal calves in Mosul city, Iraq. *Vet. World* 6(8):538-540.
- Ammar S.S.M., Mokhtaria K., Tahar B.B., Amar A.A., Redha B.A., Yuva B., Mohamed H.S., Abdellatif N. & Laid B. 2014. Prevalence of rotavírus (GARV) and coronavirus (BCoV) associated with neonatal diarrhea in calves in western Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 4(1):318-22.
- Bezerra Jr. P.S., Brandão P.E., Pavarini S.P., Varaschin M.S., Wouters F., Villarreal L.Y.B., Jerez J.A. & Costa G.N. 2009. Surto de diarreia em vacas de um rebanho leiteiro na região sul de Minas Gerais: detecção de coronavírus bovino nas fezes. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61(4):994-995.
- Barrera Valle M., Rodríguez Batista E., Betancourt Martell A., Frías Lepoux M.T. & Brandão P.E. 2014. Short communication. First report in Cuba of bovine coronavirus detection in a winter dysentery outbreak. *Span. J. Agric. Res.* 4(3):221.
- Brandão P.E., Birgel Jr E.H., Gregori F., Rosales C.A.R., Ruiz V.L.A. & Jerez J.A. 2002. Bovine coronavirus detection in adult cows in Brazil. *Arq. Inst. Biológico, São Paulo*, 69(2):103-104.
- Brandão P.E., Gregory F., Villarreal L.Y.B., Rosales C.A.R., Soares R.M. & Jerez J.A. 2005. A nested polymerase chain reaction teste for bovine coronavirus diagnosis based on the RNA-dependent RNA-polymerase gene. *Virus Res.* 10(1):45-49.
- Brandão P.E., Villarreal L.Y.B., Sousa S.L.P., Richtzenhain L.J. & Jerez J.A. 2007. Mixed infections by bovine coronavirus, rotavírus and cryptosporidium parvum in outbreak neonatal diarrhea in beef cattle. *Arq. Inst. Biológico, São Paulo*, 74(1):33-34.
- Cho Y. & Yoon K.J. 2014. An overview of calf diarrhea - infectious etiology, diagnosis, and intervention. *J. Vet. Sci.* 15(1):1-17.
- Coura F.M., Freitas M.D., Ribeiro J., De Leme R.A., De Souza C., Alfieri A.A., Facury Filho E.J., De Carvalho A.U., Silva M.X., Lage A.P. & Heinemann M.B. 2015. Longitudinal study of *Salmonella* spp., diarrheagenic *Escherichia coli*, Rotavírus, and Coronavirus isolated from healthy and diarrheic calves in a Brazilian dairy herd. *Trop. Anim. Health Prod.* 47(1):3-11.
- Dash S., Kumar K., Goel A. & Bhatia A. 2012. Detection of Corona virus antigen by ELISA from diarrhoeic cow calves in Mathura, India. *Vet. World* 5(3):166-168.
- Decaro N., Cirone F., Mari V., Nava D., Tinelli A., Elia G., Di Sarno A., Martella V., Colaianni M.L., Aprea G., Tempesta M. & Buonavoglia C. 2010. Characterisation of bubaline coronavirus strains associated with gastroenteritis in water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *Vet. Microbiol.* 145(3):245-51.
- Ferreira M.G., Facury Filho E.J., Heinemann M.B., Carvalho A.U., Lage A.P., Ferreira P.M. & Freitas M.D. 2009. Prevalência de eimeria, helmintos, *Escherichia coli*, salmonella, rotavírus, Coronavirus e *Cryptosporidium parvum* em propriedades leiteiras de Minas Gerais, Brasil. *Ciênc. Anim. Bras.* [S.l.]:524-529.
- Gregory L., Rossi R.S., Mendes J.P.G., Neuwirt N., Marques E.C., Melville P.A. & Monteiro B.M. 2014. Ocorrência dos principais agentes bacterianos e parasitários em fezes diarreicas de bezerros búfalos nos estados de São Paulo e Paraná. *Arq. Inst. Biológico, São Paulo*, 81(2):180-185.
- Herring A.J., Inglis N.F., Ojeh C.K., Snodgrass D.R. & Menzies J.D. 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16(3):473-477.
- Jerez J.A., Brandão P.E., Buzinaro M.G., Gregori F., Rosales C.A.R., Ito F.H. & Sakai T. 2002. Detecção de rotavírus e coronavírus em fezes de bezerros neonatos com diarreia criados em vários municípios do estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biológico, São Paulo*, 69(2):19-23.
- King A.A.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz E.J. 2012. *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego. 1276p.
- Midgley S.E., Banyaik K., Buesa J., Halaihel N., Hjulsager C.K., Jakab F., Kaplan J., Larsen L.E., Monini M., Poljsak-Prijatelj M., Pothier P., Ruggeri F.M., Steyer A., Koopmans M. & Böttiger B. 2012. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* 156:238-245.
- Mondal A., Chakravarti S., Majee S.B. & Bannaliker A.S. 2013. Detection of picobirnavirus and rotavírus in diarrhoeic faecal samples of cattle and buffalo calves in Mumbai metropolis, Western India. *Vet. Ital.* 49(4):357-60.
- Nataraju S.M., Chattopadhyay U.K. & Krishnan T. 2009. A study on the possibility of zoonotic infection in rotaviral diarrhoea among calves and buffalo calves in and around Kolkata, India. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 13(1):7-11.
- Niture G.S., Karpe A.G. & Prasad M. 2011. Characterization of buffalo, poultry and human rotaviruses in Western India. *Vet. Archiv* 81(3):307-319.
- Rácz M.L., Munford V., Kroeff S.S. & Kotait I. 1992. Identificação de rotavírus em amostra fecal de búfalo. 5ª Reunião Anual do Instituto Biológico, São Paulo, p.29.
- Rai R.B., Hansha A., Rai S., Singh B., Kumar H., Singh A.K., Damoran T. & Dhama K. 2011. Prevalence of rota and coronavirus infections in calves of Barabanki and Raebareli districts of Uttar Pradesh. *Indian J. Vet. Pathol.* 35(1):73-74.
- Ribeiro M.G., Langoni H., Jerez J.A., Leite D.S., Ferreira F. & Gennari S.M. 2000. Identification of enteropathogens from buffalo calves with and without diarrhoea in the Ribeira Valley, State of São Paulo, Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 37(2):159-165.
- Saif L.J. 1990. A review of evidence implicating bovine coronavirus in the etiology of winter dysentery in cows: an enigma resolved? *Cornell Vet.* 80(4):303-311.
- Stephensen C.B., Casebolt D.B. & Gangopadhyay N.N. 1999. 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.* 60(2):181-189.
- Stipp D.T., Barry A.F., Alfieri A.F., Takiuchi E., Amude A.M. & Alfieri A. 2009. Frequency of BCoV detection by a semi-nested PCR assay in faeces of calves from Brazilian cattle herds. *Trop. Anim. Health Prod.* 41(7):1563-1567.