

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL – MACPRO**

ALINE FARIAS RIBEIRO

**DETECÇÃO DE PICOBIRNAVÍRUS GENOGRUPO 2 EM AVES DE CORTE
DA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM – PARÁ – BRASIL**



BELÉM – PARÁ

2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL - MACPRO**

ALINE FARIAS RIBEIRO

**DETECÇÃO DE PICOBIRNAVÍRUS GENOGRUPO 2 EM AVES DE CORTES DA
MESORREGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM – PARÁ – BRASIL**

**Dissertação apresentada à banca
examinadora do Programa de Mestrado
em Análises Clínicas Profissional.
Orientador: Prof. Dr. René Ribeiro da
Silva.**

Belém – Pará

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

R484d RIBEIRO, ALINE.
Detecção de Picobirnavirus Genogrupo 2 em aves de corte da Mesorregião Metropolitana de Belém - Pará - Brasil / ALINE RIBEIRO. — 2019.
79 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. RENÉ SILVA
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Picobirnavirus. 2. Frangos de corte. 3. Análise molecular. 4. RT-PCR. I. Título.

CDD 571.29

Aline Farias Ribeiro

**Título: Detecção de Picobirnavírus Genogrupo 2 em Aves de Corte da
Mesorregião Metropolitana de Belém – Pará – Brasil**

Dissertação apresentada à banca
examinadora do Programa de Mestrado em
Análises Clínicas Profissional.
Orientador: Prof. Dr. René Ribeiro da Silva.

Aprovado em: 27 de abril de 2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. RENÉ RIBEIRO DA SILVA Instituição UFPA
Assinatura René R. da Silva Julgamento APROVADA

Profa. Dra. JOANA PEREIRA MASCARENHAS Instituição INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
Assinatura Joana Pereira Mascarenhas Julgamento APROVADA

Prof. Dr. ALEXANDRE DO ROSÁRIO CASSES Instituição UFPA
Assinatura Alex Julgamento APROVADA

Prof. Dra. DELANA ANDREZA MELO BÉZERRA Instituição INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
Assinatura DeLana Julgamento APROVADA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ademir e Maria do Carmo. Ao meu marido, Rubem Júnior e às minhas filhas Mariana e Manuela pelo apoio, carinho, ensinamentos, amizade, compreensão, companheirismo e amor incondicional. Sem a ajuda de vocês esta conquista não seria possível. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos da minha vida. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir a minha existência nessa vida e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu marido e minhas filhas, pelo amor dedicado e compreensão nos momentos de ausência.

À minha família (mãe, pai, irmãos, irmã, sobrinhos(as)) pelo apoio, carinho e companheirismo.

À Direção do Hospital Geral de Roraima e Secretaria de Saúde de Roraima por fazer parte desta conquista, na dispensa para realização do curso.

Ao meu orientador René, por acreditar na minha capacidade para a realização deste trabalho e principalmente pelos ensinamentos, que servirão para a minha vida profissional e pessoal.

À Dra. Joana D'ARC pela oportunidade oferecida para a realização deste trabalho e pelos ensinamentos e sugestões, sempre valiosas, que vão contribuir para a minha vida acadêmica e profissional.

À Dra. Delana pelo apoio, ensinamento, dedicação e principalmente pela paciência a mim dedicada.

À equipe do Instituto Evandro Chagas (LABVIR) pelo apoio técnico, científico e pessoal, pelos ensinamentos e companheirismo.

Ao Prof. Alexandre Casseb pelos ensinamentos e orientação.

À equipe do Laboratório do Hospital Geral de Roraima, pelo incentivo, amizade e companheirismo.

À Universidade Federal do Pará e ao Programa de Mestrado em Análises Clínicas, por oportunizar esta etapa da minha formação profissional.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.

Cora Coralina

RESUMO

As aves podem ser reconhecidas como reservatórios de vírus, sendo motivo de preocupação para os seres humanos. O Picobirnavírus (PBV) foi detectado em humanos e vários animais em todo o mundo, como: bovinos, caninos, primatas, ofídios, suínos, roedores e aves, com ou sem diarreia. Vários estudos descreveram o PBV em amostras de diferentes espécies de mamíferos e répteis; no entanto, em relação à detecção molecular do genogrupo 2 (PBV2) a partir de aves de corte, não há relatos na literatura. Este estudo teve como objetivo a detecção de PBV2, em amostras de fezes de aves de corte do gênero *Gallus*, de 37 granjas da mesorregião metropolitana de Belém/Pa, utilizando as técnicas de RT-PCR (tendo como alvo o gene RdRp) e sequenciamento, além de EGPA, para determinar o perfil eletroforético das amostras positivas na RT-PCR. Foram analisadas 85 amostras, sendo detectado PBV2 em 10 amostras (11,76%). Destas, sete foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente. Este vírus esteve presente na metade dos municípios estudados, com maior frequência no município de Santa Bárbara. Três amostras da presente pesquisa, quando comparadas com o estudo realizado por Silva (2012), foram positivas também para o genogrupo 1. A faixa etária com maior frequência para este genogrupo de PBV foi de 5 a 6 semanas. O perfil eletroforético de PBV encontrado em tres amostras positivas pela EGPA, foi o longo. Na análise filogenética foi verificada alta similaridade das amostras deste estudo, com uma amostra obtida em aves da Coreia (similaridade nucleotídica e aminoacídica com variação de 89% a 93% e 90% a 98%, respectivamente), além de alta diversidade (variaram de 39% a 66% para nucleotídeos e 24% a 73% para aminoácidos) com outras espécies de animais (suínos, humanos, bovinos e primatas não humanos). Estudos de epidemiologia molecular mais aprofundados precisam ser realizados, a fim de aprimorar o conhecimento da diversidade genética, transmissão interespecie e potencial zoonótico deste agente, ajudando na avaliação dos possíveis impactos deste vírus, na avicultura e saúde pública. O PBV2 foi detectado em granjas da mesorregião estudada, relacionando-se especificamente com outra amostra obtida em aves. Não há estudos publicados com detecção de PBV2 em aves, com isso, esta pesquisa servirá como parâmetro de positividade nesta espécie, contribuindo com informações moleculares e epidemiológicas que podem ajudar na melhor compreensão da fisiopatologia desses agentes.

Palavras-chave: Picobirnavírus. Frangos de corte. Análise molecular. RT-PCR.

ABSTRACT

Chickens can be recognized as reservoirs of viruses and are of concern to humans. Picobirnavirus (PBV) has been detected in humans and several animals worldwide, such as: cattle, canines, primates, opossums, swine, rodents and birds, with or without diarrhea. Several studies have described PBV in samples from different species of mammals and reptiles; however, in relation to the molecular detection of genogroup 2 (PBV2) from cut birds, there are no reports in the literature. The objective of this study was to detect PBV2, in Gallus cut Chicken feces, from 37 farms in the Belém/Pa metropolitan mesoregion, using RT-PCR techniques (targeting the RdRp gene) and sequencing, in addition to PAGE, to determine the electrophoretic profile of the positive samples in the RT-PCR. A total of 85 samples were analyzed and PBV2 was detected in 10 samples (11.76%). Of these, seven were sequenced and analyzed phylogenetically. This virus was present in half of the municipalities studied, most frequently in the municipality of Santa Bárbara. Three samples of the present study, when compared with the study by Silva (2012), were also positive for genogroup 1. The age group with the highest frequency for this PBV genogroup was 5 to 6 weeks. The electrophoretic profile of PBV found in three samples positive by PAGE was the long one. In the phylogenetic analysis, a high similarity of the samples of this study was observed, with a sample obtained in birds from Korea (nucleotide and amino acid similarity ranging from 89% to 93% and 90% to 98%, respectively), as well as high diversity 39% to 66% for nucleotides and 24% to 73% for amino acids) with other animal species (swine, humans, cattle and non-human primates). Further molecular epidemiological studies need to be carried out in order to improve the knowledge of the genetic diversity, interspecies transmission and zoonotic potential of this agent, helping to evaluate the possible impacts of this virus on poultry and public health. PBV2 was detected in farms of the mesoregion studied, specifically comparing with another sample obtained in Chickens. There are no published studies with detection of PBV2 in chickens, therefore, this research will serve as a parameter of positivity in this species, contributing with molecular and epidemiological information that may help in better understanding the pathophysiology of these agents.

Key words: Picobirnavirus. Broiler chickens. Molecular analysis. RT-PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Volume de exportação de carne de frango de 2007 a 2017	18
Figura 2	Estrutura da partícula de Picobirnavírus	21
Figura 3	Estrutura da partícula de Picobirnavirus demonstrando o genoma e a estrutura triacontaédrica	22
Figura 4	Demonstração dos perfis eletroforéticos longo e curto de PBV	23
Figura 5	Estrutura do genoma de PBV de Humanos, Otários, Lapinos e bovinos	24
Figura 6	Mapa mostrando a detecção e distribuição global de PBV em diferentes estudos.	26
Figura 7	Municípios em que foram realizadas as colheitas das amostras	38
Figura 8	Representação do preparo da suspensão fecal	40
Figura 9	Representação esquemática da extração do genoma viral	41
Figura 10	Representação da Técnica de EGPA	42
Figura 11	Representação esquemática da técnica de RT-PCR	44
Figura 12	Representação esquemática da técnica de preparo do gel de Agarose a 2% e visualização dos fragmentos de DNA	44
Figura 13	Representação da técnica de Sequenciamento	45
Figura 14	Perfil eletroforético do PBV por EGPA	48
Figura 15	Amostras positivas por RT-PCR para Picobirnavirus Genogrupo 2	49
Figura 16	Árvore Filogenética construída usando o gene RdRp de PBV	54
Gráfico 1	Efetivo do rebanho de galináceos no ano de 2017 (Mil cabeças) e por região	17
Gráfico 2	Quantitativo de rebanho de galináceos no estado do Pará (Mil cabeças)	19
Gráfico 3	Quantitativo de rebanho de galináceos na mesorregião metropolitana de Belém (Mil cabeças)	20
Quadro 1	Estudos de detecção de PBV em diferentes espécies e países, mostrando os genogrupos, frequências encontradas e metodologia utilizada	27
Quadro 2	Estudos de detecção de PBV em aves, em diferentes espécies e países, identificando o genogrupo e a frequência encontrada	28

Quadro 3	Quantidade de amostras colhidas por município e classificadas por faixa etárias	39
Quadro 4	Sequências dos iniciadores para detecção do Genogrupo 2 de PBV por RT-PCR	43
Quadro 5	Amostras de PBV2 utilizadas para comparação com as amostras positivas deste estudo	46
Quadro 6	Demonstrativo das amostras com infecção mista por PBV por RT-PCR	50
Quadro 7	Análise da similaridade nucleotídica entre as amostras de PBV2 deste estudo	53
Quadro 8	Análise da similaridade de aminoácido entre as amostras de PBV2 deste estudo	53
Quadro 9	Análise da similaridade de nucleotídeo entre as amostras de PBV2 desse estudo e outros da literatura	54
Quadro 10	Análise da similaridade de aminoácido entre as amostras de PBV2 desse estudo e outros da literatura	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detecção de PBV2 por RT-PCR, em oito municípios da mesorregião metropolitana de Belém	51
Tabela 2	Detecção de PBV2 em frangos por faixa etária	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABPA** – Associação Brasileira de Proteína Animal
- ADEPARA** – Agência de Defesa do Estado do Pará
- cDNA** – cópia do Ácido Desoxiribonucleico
- CN** – Controle Negativo
- CNA** – Confederação Nacional da Agricultura
- CP** – Capsídeo
- DNA** – Ácido Desoxiribonucleico
- EGPA** – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
- EMBRAPA** – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
- EUA** – Estados Unidos da América
- IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- ICTV** – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
- IEC** – Instituto Evandro Chagas
- mA** – Mili-amper
- NCBI** – Centro Nacional de Informação em Biotecnologia
- ng** – Nanogramas
- ORF** – Região de Leitura Aberta
- pb** – Pares de Base
- PBV** – Picobirnavirus
- PBV1** – Picobirnavírus genogrupo 1
- PBV2** - Picobirnavírus genogrupo 2
- PCR** - Reação em Cadeia mediada pela Polimersase
- PM** – Peso Molecular
- RNAfd** – Ácido Ribonucleico fita dupla
- RT-PCR** – Reação em Cadeia mediada pela Polimersase precedida de Transcrição Reversa
- RV** - Rotavírus
- TA** – Temperatura Ambiente
- TBE** – Tampão Tris Base
- UBABEFF** – União Brasileira de Avicultura
- UE** – União Européia
- V** – Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	AVICULTURA NO BRASIL E NO ESTADO DO PARÁ	16
1.2	AGENTES VIRAIS QUE AFETAM O TRATO GASTROENTÉRICO	20
1.3	PICOBIRNAVÍRUS	21
1.3.1	Classificação	21
1.3.2	Morfologia	21
1.3.3	Organização genômica	23
1.4	EPIDEMIOLOGIA	26
1.5	PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	28
1.6	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO	30
1.6.1	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)	30
1.6.2	Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR)	31
1.6.3	Sequenciamento gênico	32
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO GERAL	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4	APRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA A SER EMPREGADA	37
4.1	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	37
4.2	ÁREA DO ESTUDO	38
4.3	COLHEITA DAS AMOSTRAS	39
4.4	PREPARO DA SUSPENSÃO FECAL	40
4.5	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEICO VIRAL	41
4.6	ANÁLISE POR EGPA PARA CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE PBV	42
4.7	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR)	43
4.8	ANÁLISE EM GEL DE AGAROSE	44
4.9	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO	45
4.10	SEQUENCIAMENTO GÊNICO	45
4.11	ANÁLISES FILOGENÉTICAS	46
4.12	DETECÇÃO DE PBV1 E PBV2	47

4.13	MÉTODO ESTATÍSTICO	47
5	RESULTADOS	48
5.1	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA)	48
5.2	REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR).	49
5.3	SEQUENCIAMENTO GÊNICO	52
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	64
	APÊNDICE	74
	ANEXO	79

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango e o primeiro em exportação, ficando na frente dos Estados Unidos, China e União Europeia (UE), o que representou uma divisa para o País de cerca de 7,1 bilhões de dólares, no ano de 2017 (AVISITE, 2018)¹. Neste contexto é notável a importância do setor avícola brasileiro para a economia do país e com isso há a necessidade de que se priorize as questões sanitárias, no intuito de manter o padrão de qualidade dos produtos exportados e a monitorização de determinadas doenças que afetam as aves (CNA, 2017)².

Muitas doenças infecciosas em seres humanos são causadas por patógenos provenientes de uma grande variedade de animais. Estima-se que mais de 60% das doenças emergentes sejam originárias da fauna selvagem. A atenção para as zoonoses aumentou recentemente devido aos riscos à saúde pública e seus impactos econômicos (BENGIS et al., 2004; CHOMEL; BELOTTO; MESLIN, 2007; CUTLER; FOOKS; VAN DER POEL, 2010; MACKENZIE; JEGGO, 2013).

As aves são reconhecidas como reservatórios frequentes de vírus que são motivo de preocupação para os seres humanos. O impacto econômico das infecções entéricas causadas por diversos vírus na indústria avícola tem sido avaliado, sendo variável de acordo com os efeitos econômicos significativos. As doenças entéricas tendem a afetar predominantemente aves jovens, no entanto, pode ocorrer em todos os grupos etários, o que aumenta a suscetibilidade a outras doenças, diminuindo a eficiência da alimentação e prolongando o tempo de comercialização (BERNS; PARRISH, 2007; SAIF et al., 2008).

O Picobirnavírus (PBV) foi detectado em humanos e vários animais em todo o mundo, como: bovinos, caninos, primatas não humanos, répteis, suínos, roedores e aves, com ou sem diarreia. Sua associação a quadros de diarreia aguda aquosa e gastroenterite em seres humanos, tanto como único patógeno quanto em associação com outros patógenos entéricos é frequente na literatura (GIORDANO et al., 1999; GANESH et al., 2010; SMITS et al., 2012). Eles ainda são classificados como "patógenos oportunistas", uma vez que foram detectados em pacientes imunocomprometidos. Quanto ao seu potencial zoonótico ou mesmo de transmissão

¹ http://www.revistadoavisite.com.br/web/temp_site/edicao-dc49dfebb0b00fd44aeff5c60cc1f825.pdf

² <http://www.cnabrasil.org.br/noticias/brasil-e-o-segundo-maior-produtor-mundial-de-frango>

interespécies já foi descrito em alguns estudos e, particularmente os suínos são considerados importantes reservatórios para a diversidade de amostras humanas (GANESH; MASACHESSI; MLADENOVA, 2014; MACEDO, 2014)

1.1 AVICULTURA NO BRASIL E NO ESTADO DO PARÁ

A história da avicultura brasileira tem seus primeiros relatos no descobrimento do Brasil, com a carta de Pero Vaz de Caminha, onde cita a presença de aves no novo território descoberto, além da apreciação da família real portuguesa pela carne de frango. Com o crescimento populacional e da economia maiores necessidades surgiram e conseqüentemente estimularam a produção com fins comerciais, sendo que o estado de Minas Gerais foi o pioneiro, abastecendo boa parte do território nacional (UBABEFF, 2011)³.

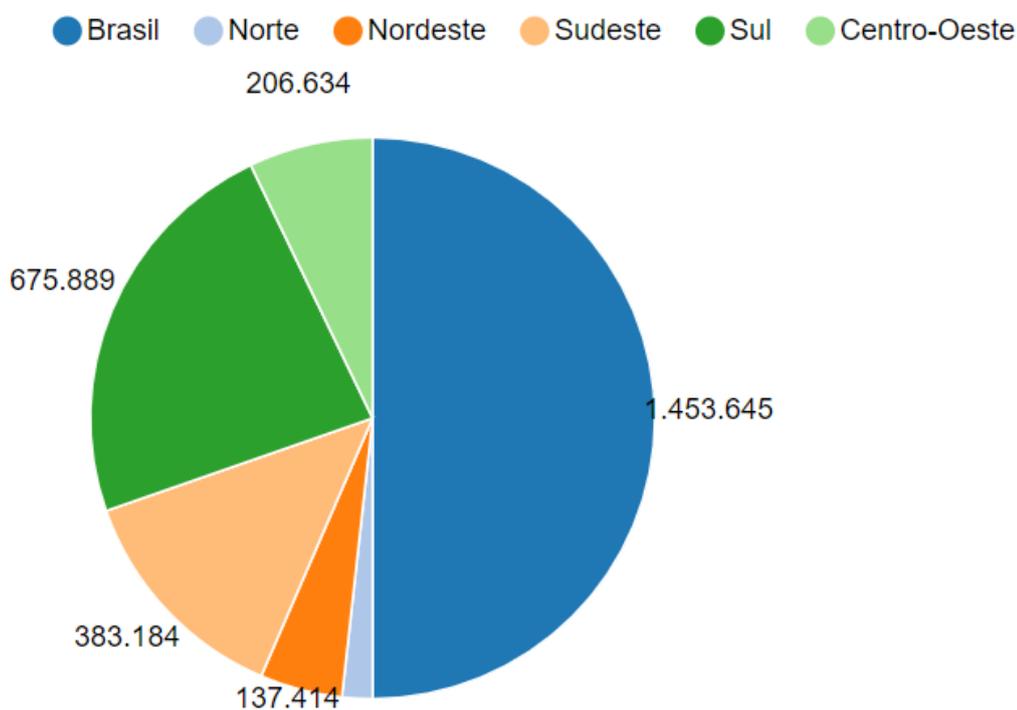
Em 1937, foram importadas as primeiras matrizes de aves do Japão pelo Brasil, dando início à relação comercial desses animais, do Brasil com outros países. A criação e o abate de frango ganharam impulso nas décadas de 50 e 60, iniciando-se um novo ciclo de modernas técnicas de produção, ampliando-se os cuidados quanto à dieta alimentar, controlando-se as rações utilizadas para alimentação e o cuidado com a sanidade avícola desses animais, com o intuito de monitorar as condições sanitárias de granjas e frigoríficos evitando o surgimento de doenças. Com a criação do sistema de integração na avicultura brasileira, onde há um relacionamento comercial entre a agroindústria e os pequenos produtores rurais, há a inserção da moderna avicultura na economia capitalista consolidando desta forma o caráter industrial desta atividade e alavancando a produção a um estado ímpar de produtividade, colocando a avicultura brasileira como uma das melhores do mundo (UBABEFF, 2011; AVICULTURA INDUSTRIAL, 2016⁴).

³ <http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/fcc1856de5f036bb47a8a246a0781e26.pdf>

⁴ <https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/sistema-de-integracao-na-avicultura/20101216-084637-g405>

A avicultura brasileira sofreu uma expansão no cenário econômico nacional, sendo que no ano de 2011 obteve uma participação de 22,74% do agronegócio brasileiro, correspondendo a 1,5% do PIB nacional naquele ano e em 2012 obteve um aumento de 2,3% comparado ao ano anterior, seguindo da mesma forma nos anos seguintes (UBABEFF, 2011; FOLHA WEB, 2012). Em 2017 o Brasil produziu 13,1 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que 32% desta produção foi destinada às exportações e 68% ao mercado interno (AVISITE, 2018). De acordo com os dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Brasil se coloca como o terceiro maior consumidor de carne de frango, com consumo de 9,2 milhões de toneladas em 2017 (CNA, 2017; AVISITE, 2018). O seu rebanho em 2017 era de 1,45 bilhão de cabeças, sendo que o maior rebanho está na região Sul, seguida das regiões Sudeste, Nordeste, Centro-Oeste e Norte (Gráfico 1) (IBGE, 2018)⁵.

Gráfico 1 – Efetivo do rebanho de galináceos no ano de 2017 (Mil cabeças) e por região.



Fonte: IBGE (2018).

A avicultura brasileira se consolidou como a primeira no ranking da exportação mundial, ficando na frente inclusive dos EUA, que é o maior produtor. No agronegócio

⁵ <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>

brasileiro está em terceiro lugar, superada apenas pela exportação de soja e açúcar, gerando uma receita para o país de 7,1 bilhões de dólares e volume exportado de 4,2 milhões de toneladas no ano de 2017 (Figura 1) (CNA, 2018; ABPA, 2018⁶; AVISITE, 2018).

Figura 1– Volume de exportação de carne de frango de 2007 a 2017.

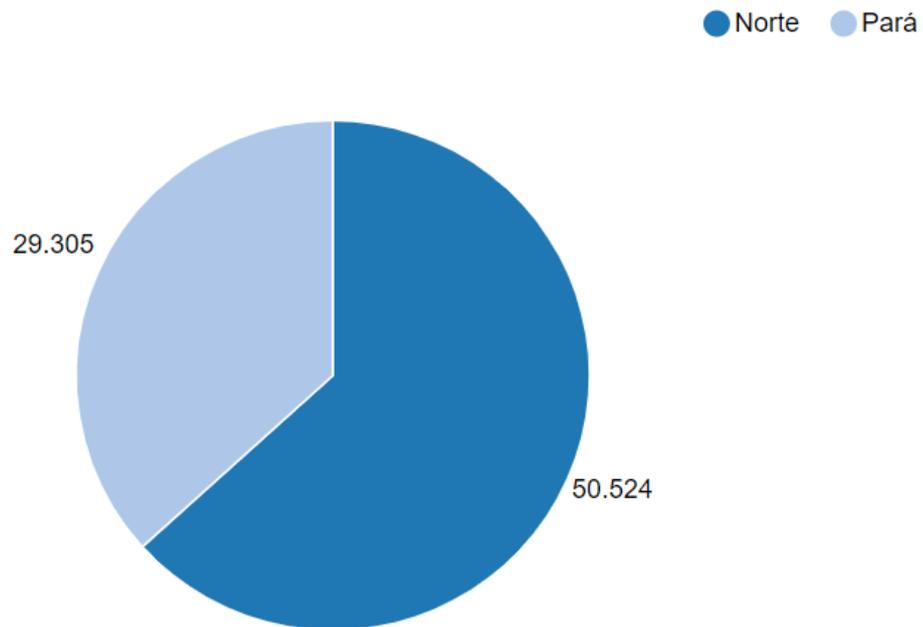


Fonte: AVISITE, 2018.

⁶ <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo>

Na Região Norte o plantel da avicultura paraense está em primeiro lugar em número de cabeças, com um rebanho de 29,30 milhões de cabeças representando 58% da região, estando presente em 23 dos 143 municípios paraenses segundo dados do Agência de Defesa Agropecuária do Pará (ADEPARÁ, 2018; IBGE, 2018) (Gráfico 2).

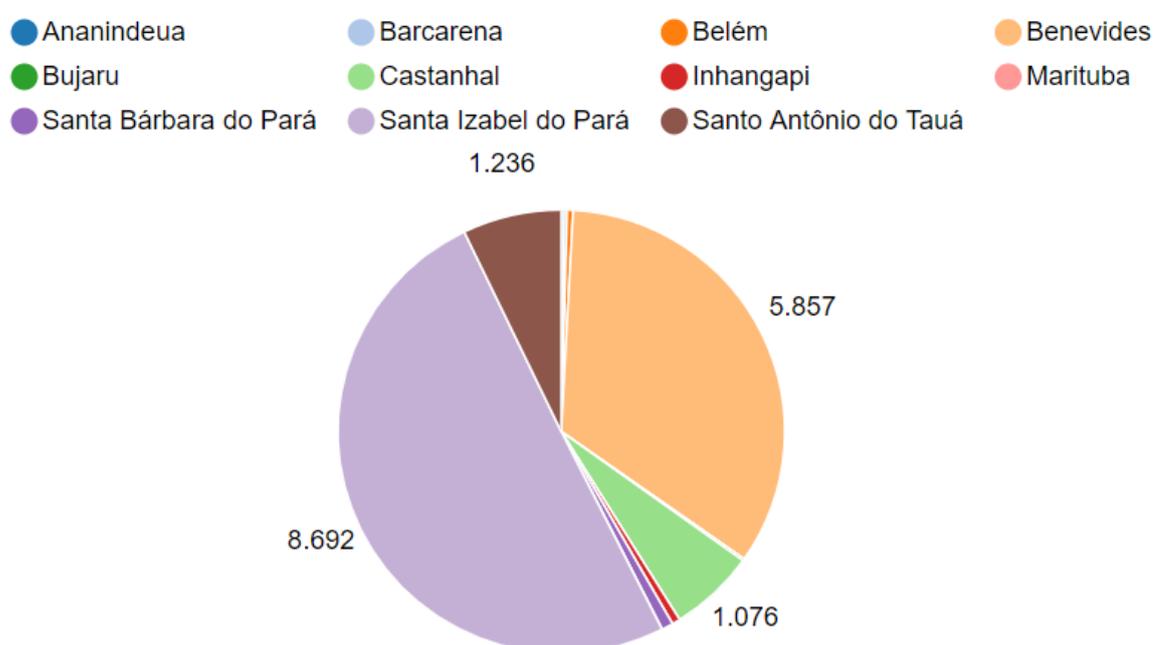
Gráfico 2 – Quantitativo de rebanho de galináceos no estado do Pará (Mil cabeças).



Fonte: IBGE, 2018.

A mesorregião metropolitana de Belém concentra o maior rebanho do estado representando 59% deste rebanho, com 17.278 cabeças. Os municípios de Benevides e Santa Isabel são os principais polos de produção e apresentam o maior plantel da região (Gráfico 3), representando 1% do plantel brasileiro (IBGE, 2018). Em 2016, o Pará assumiu o 10º lugar no ranking nacional, com um faturamento de um pouco mais de R\$ 1 bilhão (EMBRAPA, 2018)⁷.

Gráfico 3 – Quantitativo de rebanho de galináceos na Mesorregião metropolitana de Belém (Mil cabeças).



Fonte: IBGE, 2018

1.2 AGENTES VIRAIS QUE AFETAM O TRATO GASTROENTÉRICO

Os agentes virais que estão envolvidos com casos agudos de diarreia são: Rotavírus; Adenovírus; Norovírus, Sapovírus e Astrovírus. Outros vírus foram citados como possíveis agentes causadores de gastroenterite ou mesmo como patógenos oportunistas tais como: Coronavírus, Torovírus, Vírus de Aichi, Bocavírus, pestivírus e o Picobirnavírus (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008; GOLDBERG; STAMM, 2016).

⁷ <http://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/brasil>

1.3 PICOBIRNAVÍRUS

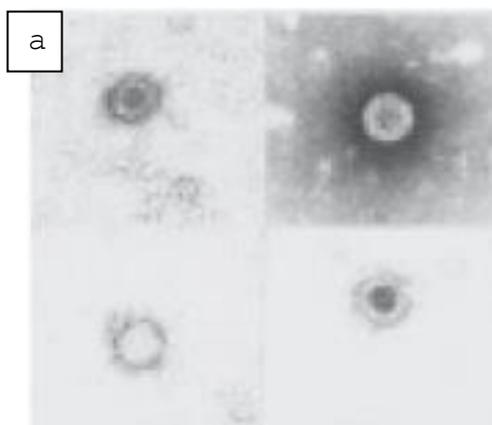
1.3.1 Classificação

O PBV pertence ao gênero *Picobirnavirus*, família *Picobirnaviridae*, a qual possui duas espécies reconhecidas Comitê de Taxonomia de Vírus (ICTV), *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus*, porém há outras espécies sugeridas (*Bovine picobirnavirus*; *Chicken picobirnavirus*; *Dog picobirnavirus*; *Foal picobirnavirus*; *Giant anteater picobirnavirus*; *Guinea pig picobirnavirus*; *Hamster picobirnavirus*; *Porcine picobirnavirus*; *Rat picobirnavirus* e *Snake picobirnavirus*) que podem pertencer ao gênero *Picobirnavirus*, mas ainda não foram reconhecidas pelo ICTV (ICTV, 2018), como novas espécies.

1.3.2 Morfologia

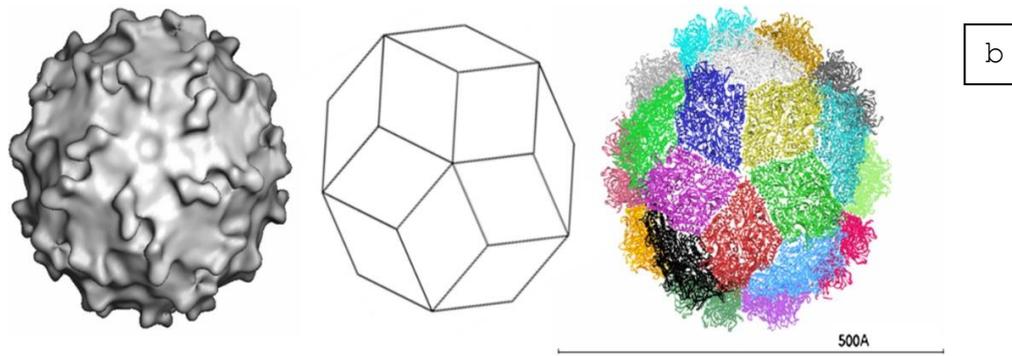
A origem do nome *Picobirnavírus* advém do prefixo “pico” que se refere ao diminuto tamanho do vírion (33 a 37 nm de diâmetro) e “birna” representa o genoma viral constituído por dois segmentos de RNA de fita dupla (RNAfd), que codificam de 3 a 4 proteínas. O genoma total com cerca de 4,2 kpb é circundado por uma única camada de capsídeo (Figura 2a, b). As partículas do vírus tem uma organização triacontaédrica esférica (30 lados) (Figura 3). O vírion não possui envelope (GANESH; MASACHESSI; MILADENOVA, 2014; ICTV, 2018⁸).

Figura 2 – Estrutura da partícula de *Picobirnavirus*.



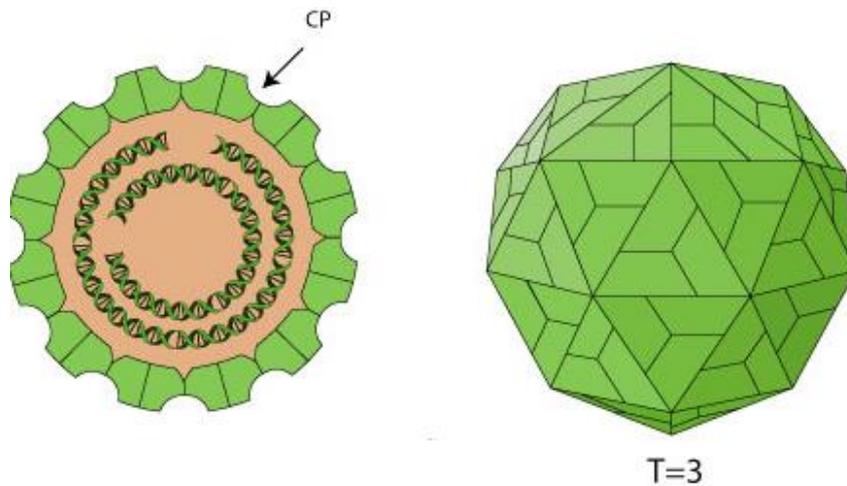
Fonte: KASPER et al. (2016)

⁸ https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/186/picobirnaviridae



Fonte: ICTV (2011). (a) PBV por microscopia eletrônica; (b) Desenho triacontaédrico da partícula de PBV.

Figura 3 – Estrutura da partícula de *Picobirnavirus* demonstrando o genoma e a estrutura triacontaédrica.



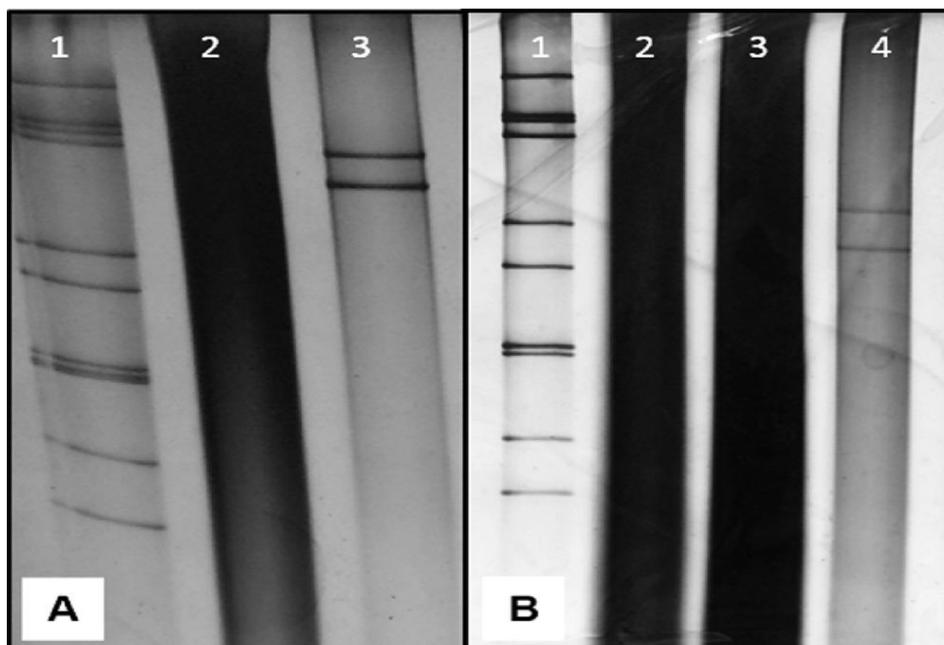
Fonte: Adaptado de SIB (2017). CP: Capsídeo; T=3: Simetria Triacontaédrica.

No citoplasma da célula hospedeira ocorre a replicação do vírus mediada pela polimerase, esse processo ocorre dentro do vírion e o material genético do vírus (RNAfd) nunca é exposto ao citoplasma, sendo usado como modelo para tradução, onde a fita de RNA (+) é transcrita para originar a fita de RNA (-), a qual será emparelhada para originar a fita de RNAfd, libertando os vírions maduros por brotação (SIB, 2018).

1.3.3 Organização genômica

De acordo com vários autores, o tamanho estimado dos segmentos gênicos do PBV é baseado no perfil eletroforético do Rotavírus do grupo A, utilizando a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA), sendo que o perfil de migração dos dois segmentos de RNAfd, pode ser classificado em perfil de genoma longo ou curto (PEREIRA et al., 1988a; GATTI, 1994; GALLIMORE et al., 1995a; ROSEN et al., 2000; WAKUDA; PONGSUWANNA; TANIGUCHI, 2005; BHATTACHALYA et al., 2006; DUQUERROY et al., 2009), como demonstrado na Figura 4. No perfil longo o tamanho estimado dos segmentos maiores e menores de PBV, correspondem de 2,2kb - 2,7kb e 1,2kb - 1,9kb, respectivamente, enquanto que no perfil curto, o segmento 1 tem 2,2kpb e o segmento 2 tem 1,2kpb (MALIK, et al., 2014a, 2015).

Figura 4 – Demonstração dos perfis eletroforéticos longo e curto de PBV.



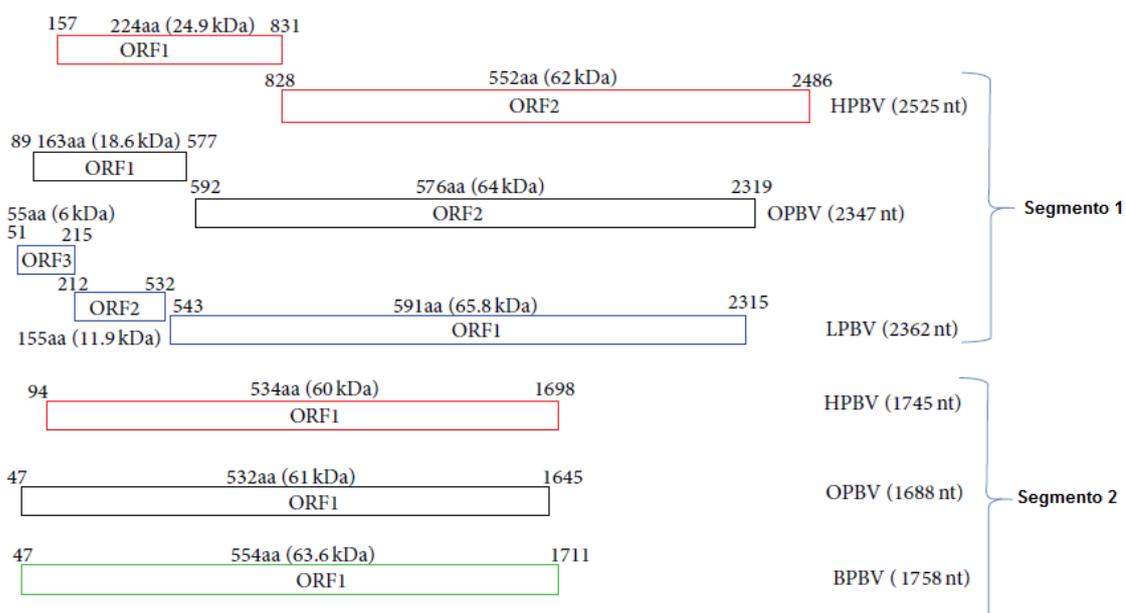
Fonte: TAKIUSHI et al. (2016). Em A, 1 = Padrão de Rotavírus Bovino; 2 = Amostra Negativa; 3 = PBV de perfil longo; Em B, 1 = Padrão de Rotavírus A bovino; 2 e 3 = Amostras negativas; 4 = PBV de perfil curto.

Há apenas seis genomas completos de PBV a partir de diferentes espécies de animais na base de dados de genes (NCBI, 2018)⁹. Até o momento não há na base de dados citando a caracterização genotípica completa do PBV em aves (VERMA et al., 2014; GONZALEZ et al., 2017; NCBI, 2018). Os segmentos 1 e 2 de PBV humano, de lapino (coelho), bovino e de otarino (leão marinho) estão ilustrados na Figura 5. O segmento 1 ou maior de PBV, tem cerca de 2,2 - 2,7 kpb (MALIK et al., 2014a) com

⁹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/?term=picobirnavirus>

duas ou três regiões de leituras abertas (ORFs) de acordo com a espécie e codifica para uma proteína não estrutural (S1NSP) de função desconhecida e a proteína do capsídeo (S1CP). O segmento 2 ou segmento menor tem 1,2-1,9 kbp e codifica para uma única proteína, a RNA polimerase dependente de RNA viral (RdRp) (S2RDRP) (ICTV, 2011; GANESH; MASACHESSI; MILADENOVA, 2014; MALIK et al., 2014a). Em um estudo realizado no Brasil, foi descrito, com base na característica morfológica e eletroferotipo, que o PBV em galinhas pode apresentar um genoma trisegmentado (LEITE et al., 1990), este achado também foi relatado por Ludert; Liprandi (1993), em crianças com gastroenterite na Venezuela. No entanto, de acordo com Ganesh et al. (2012), não está claro se pode se tratar de um vírus com genoma trisegmentado ou estar relacionado a infecções mistas pelos dois genogrupos de PBV.

Figura 5 – Estrutura do genoma de PBV de Humanos, Otarinos, Lapinos e bovinos



Fonte: Adaptado de MALIK et al. (2014a). ORFs em Humanos (HPBV), Bovinos (BPBV), Otários (OPBV) e Lapinos (LPBV). nt: Nucleotídeo, aa: Aminoácido.

O segmento 1 de PBV é altamente divergente, especialmente na região S1NSP, representando um desafio técnico para a posterior caracterização genética das espécies de PBV. O PBV humano possui duas ORFs grandes de 224 aminoácidos (ORF1) e 552 aminoácidos (ORF2). Embora a funcionalidade da ORF1 não seja clara, ela codifica para uma proteína de função desconhecida e não estrutural, a ORF2 codifica para uma proteína do capsídeo (CP). Para o PBV de coelho, o segmento 1 é dividido em 3 ORFs, a expressão de ORF3 resulta na síntese de um precursor para

gerar um peptídeo grande e o CP maduro (ICTV, 2011; GANESH; MASACHESSI; MILADENOVA, 2014).

O segmento 2 de PBV codifica para o gene RdRp e é suficientemente conservado para permitir o desenho de iniciadores para sequenciamento, mesmo para novas espécies (GONZALES et al., 2017). No entanto, as análises das sequências parciais e totais deste segmento, revelaram elevada heterogeneidade entre as cepas de PBV intra e entre espécies. A comparação de sequências de nucleotídeos e de aminoácidos de uma curta sequência do segmento 2 (gene RdRp) do PBV norteia a proposta atual de classificação dos PBV em genogrupo I (PBV 1) e II (PBV 2) (PEREIRA et al., 1988a; GATTI et al., 1989; GALLIMORE et al., 1995b; ROSEN et al., 2000; WAKUDA et al., 2005; BHALTACHARYA et al., 2007; DUQUERROY et al., 2009; FREGOLLENTE; GATTI, 2009; GONZALEZ et al., 2017).

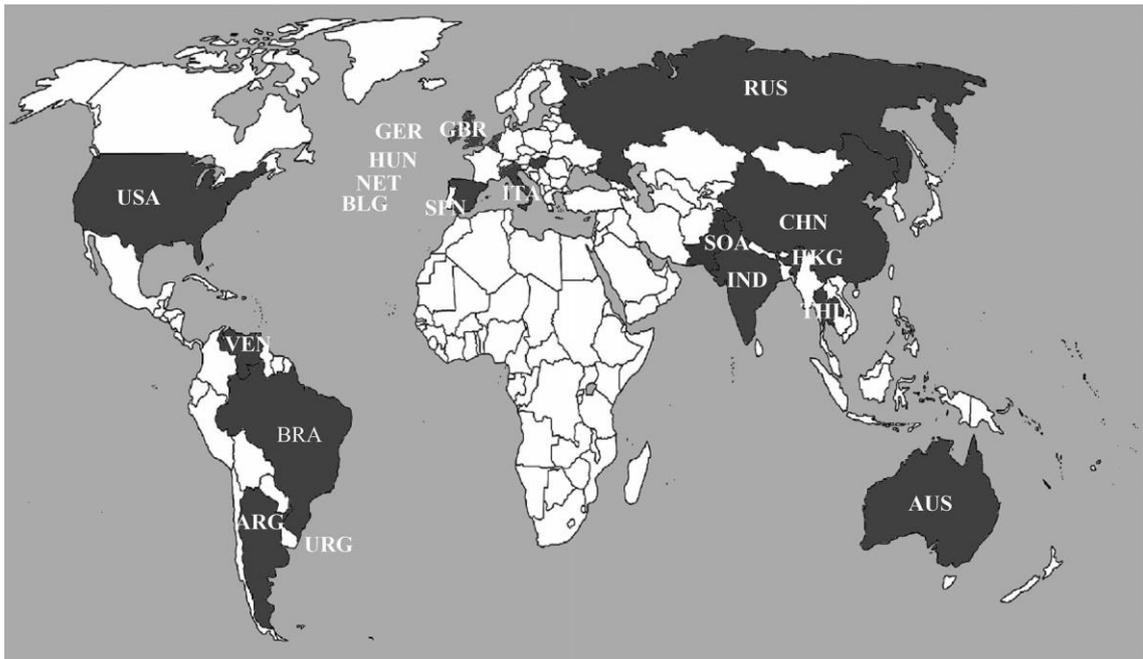
Alguns autores relatam que a similaridade entre PBV 1 e PBV 2 para os nucleotídeos varia de 37% a 40% e 17% a 28% para a sequência de aminoácidos, no entanto, para um mesmo genogrupo pode variar de 60% a 87% e 64% a 90% para nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente, constatando assim a sua alta variabilidade genética. Contudo, há poucos relatos na literatura sobre a relevância clínica e biológica dos genogrupos (ROSEN et al., 2000; BÁNYAI et al., 2003; MARTINEZ et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2006; BHATTACHARYA et al., 2007; SYMONDS; GRIFFIN; BREITBART, 2009; GANESH et al., 2010; VAN LEEUWEN et al., 2010; MACEDO, 2014).

Foi proposto por Fregollente e Gatti, em 2009, uma padronização para a nomenclatura de PBV, sendo nomeado pelo genogrupo (G1 ou G2), seguido de PBV, espécie do hospedeiro, código do país com 3 letras, nome da amostra e ano de isolamento. Este modelo é utilizado por alguns autores até hoje (TAKIUCHI et al., 2016; KUNZ, 2017).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

Numerosos estudos demonstraram a detecção de PBV em animais de vários países (Figura 6) e diferentes espécies, incluindo humanos, bovinos, bubalinos, suínos, roedores, equinos, caninos, felinos, primatas não humanos e répteis (Quadro 1).

Figura 6 – Mapa mostrando a detecção e distribuição global de PBV em diferentes estudos.



Fonte: GANESH; MASACHESSI; MILADENOVA (2014). *A cor cinza localiza os países onde o Picobirnavirus foi detectado em qualquer espécie animal e águas residuais.

Quadro 1 – Estudos de detecção de PBV em diferentes espécies e países, mostrando os genogrupos, frequências encontradas e metodologia utilizada.

ESPÉCIE	GENOGRUPO	MÉTODO	FREQUÊNCIA	PAÍS	REFERÊNCIA
Bovinos	PBV1	EGPA e RT-PCR	---	Índia	GHOSH et al. (2009)
	PBV NI	EGPA	2,22%	Índia	MONDAL et al. (2013)
	PBV1 e PBV2	RT- PCR	---	Índia	MALIK et al. (2015)
	PBV1	EGPA e RT- PCR	8,3% e 62,5%	Brasil	TAKIUSHI et al. (2016)
Bubalino	PBV NI	EGPA	4,41%	India	MONDAL et al. (2013)
Caninos	PBV NI	EGPA	1,8%	Brasil	COSTA el al. (2004)
	PBV1	EGPA e RT- PCR	0,86% e 66,6%	Brasil	FREGOLENTE et al.(2009)
Equinos	PBV NI	EGPA	1,84%	Irlanda/UK	BROWNING et al. (1991)
	PBV1	RT- PCR	14,3%	Índia	GANESH et al. (2011a)
Felinos	PBV NI	RT- PCR	3,63%	Portugal	NG et al. (2014)
Humanos	PBV NI	EGPA	0,43%	Itália	CASCIO et al. (1996)
	PBV1 e PBV2	EGPA e RT- PCR	2,47% e 35,7%	Índia	BATTACHARYA et al. (2007)
	PBV1 e PBV2	RT- PCR	20,5% e 1,2%	Holanda	VAN LEEUWEN et al. (2010)
	PBV1 e PBV2	RT- PCR	---	Índia	GANESH et al. (2011b)
Répteis	PBV1	EGPA e RT- PCR	8,5% e 28,6%	Brasil	FREGOLENTE et al. (2009)
Roedores	PBV NI	EGPA	6,66%	Brasil	PEREIRA et al. (1988b)
	PBV1	EGPA e RT- PCR	25% e 50%	Brasil	FREGOLENTE et al. (2009)
Suínos	PBV1	EGPA e RT- PCR	10% e 65%	Hungria	BÁNYAI et al. (2008)
	PBV1	EGPA e RT- PCR	29,6% e 8,1%	Argentina	GIORDANO et al. (2011)
	PBV1 e PBV2	RT- PCR	26,6% e 6,5%	China e Siri	SMITS et al. (2011)
	PBV1	EGPA e RT- PCR	18,2%	Lanka	
	PBV1 e PBV2	RT- PCR	84,6% e 38,5%	Índia	GANESH et al. (2012)
	PBV1	RT- PCR	29,5%	China	CHEN et al. (2014)
Primatas não Humanos	PBV1	RT-PCR	64,1%	Tailândia	WILBURN et al. (2016)
	PBV1	EGPA e RT- PCR	5,92% e 93,7%	China	WANG et al. (2012)
	PBV1	EGPA e RT- PCR		Caribe	GALLAGHER et al (2017)

Fonte: Adaptado de GANESH et al. (2012); MACEDO (2014); MALIK et al. (2014a). PBV NI: Genogrupo de Picobirnavirus Não Identificado; PBV1: Picobirnavirus genogrupo 1; PBV2: Picobirnavirus genogrupo 2; EGPA: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida; RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa.

A maioria dos relatos de PBV na literatura, em animais, tem sido registrado na espécie suína. Nas aves, há relatos em frangos, avestruz, faisão, ganso e perus (Quadro 2) (LEITE et al., 1990; DAY; MASACHESSI et al., 2007; ZSAC, 2010; MACEDO, 2014).

Quadro 2 – Estudos de detecção de PBV em aves, em diferentes espécies e países, identificando o genogrupo e a frequência encontrada.

ESPÉCIE	GENOGRUPO	MÉTODO	FREQUÊNCIA	PAÍS	REFERÊNCIA
FRANGO	PBV NI	EGPA	14,2%	Brasil	ALFIERI et al. (1988)
FRANGO	PBV NI	EGPA	17,1%	Brasil	LEITE et al. (1990)
FRANGO	PBV NI	EGPA	3,4%	Brasil	TAMEHIRO et al. (2003)
PERU	PBV NI	Metagenômica	---	EUA	DAY et al. (2010)
EMA	PBV1	EGPA e RT-PCR	43% e 69,2%	Argentina	MASACHESSI et al. (2012)
FRANGO	PBV1	EGPA e RT-PCR	15,3% e 49,4%	Brasil	SILVA et al. (2014)
PERU	PBV1	RT-PCR	56,6%	EUA	VERMA et al., (2014)

Fonte: Adaptado de SILVA (2012). PBV NI: Genogrupo de Picobirnavírus Não Identificado; PBV1: Picobirnavírus genogrupo 1; EGPA: Eletroforese em Gel de Poliacrilamida; RT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase precedida de Transcrição Reversa.

Martinez et al. (2010) detectaram PBV em suínos de diferentes idades e estados patológicos, com maior excreção viral em períodos de lactação e fase final da gestação, sugerindo que um determinado estado fisiológico pode favorecer a excreção deste vírus. Masachessi et al. (2012) detectaram PBV em emas jovens e adultas, no entanto relataram que não havia diferenças na excreção viral com a idade do animal. Verma et al. (2014) relataram a presença de PBV em perus de 2 a 3 semanas de idade, sugerindo que nesta fase há a maior infecção por este agente. Em um estudo realizado no Brasil foi encontrado PBV em bezerros com até 60 dias de vida (TAKIUSHI et al., 2016).

Em relação ao PBV 2, há poucos relatos na literatura, limitados a detecção em humanos, bovinos e suínos (BHATTACHARYA et al., 2006; VAN LEEUWEN et al., 2010; GANESH et al., 2011b; SMITS et al., 2011) (ver Quadro 1). No entanto, até o momento não há relatos confirmados na literatura da presença de PBV2 em aves.

1.5 PATOGENIA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O PBV ainda não foi confirmado como o causador de gastroenterites, mesmo sendo frequente nas fezes de diferentes hospedeiros. No entanto, há poucos estudos epidemiológicos na tentativa de descrever a sua infecção natural (MACEDO, 2014). O papel do PBV como agente causador de doenças em seres humanos ainda é

controverso. Embora a presença do vírus em amostras de fezes de adultos e crianças com diarreia já tenha sido descrita, a relação etiológica do PBV com a síndrome diarreica não pode ser estabelecida, já que também foi relatada a presença desse vírus em hospedeiros assintomáticos (GANESH et al., 2010). O PBV está atualmente listado como patógeno emergente e oportunista com sintomatologia de diarreia, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (GROHMANN et al., 1993; GONZÁLEZ et al., 1998; GIORDANO et al., 1999; ROSEN et al., 2000; MARTÍNEZ et al., 2003; TAKIUCHI et al., 2016).

Martinez et al. (2010) sugeriram que a infecção por PBV pode ser adquirida no início da vida, podendo estabelecer uma infecção persistente, com períodos de alta atividade viral alternados com períodos de latência, isto é, animais adultos infectados podem ser considerados portadores assintomáticos e reservatórios para o vírus.

Freitas (2003) observou descamações discretas nas vilosidades do jejuno de ratos infectados com PBV. As fezes desses animais apresentavam consistência não diarreica, levando-o a concluir que o vírus causava a infecção sem sinais clínicos de diarreia.

Pesquisas realizadas em aves no Brasil não correlacionam à presença de PBV e a consistência alterada das fezes (ALFIERI et al., 1988; LEITE et al., 1990; MONTEIRO et al., 1991). No entanto, Tamehiro et al. (2003) relataram que há uma significância entre a presença de PBV e a consistência pastosa/líquida das fezes, com sinais clínicos de enterite.

Malik et al. (2014b) encontraram PBV1 e PBV2 em um bezerro com diarreia, na Índia, mostrando a possibilidade de coinfecção entre cepas de PBV e concluíram que a infecção por PBV2 pode ter um risco de gastroenterite nesses animais, inclusive relacionados a problemas econômicos. Smits et al. (2011) detectaram PBV1 e PBV2 no trato respiratório de suínos, porém sem sinais respiratórios de doença. Em humanos os dois genogrupos foram detectados, na Índia, em crianças com diarreia aquosa aguda e sintomas de desidratação (BATTACHARYA et al., 2007; GANESH et al., 2011b). Van Leuven et al. (2010), detectaram PBV1 e PBV 2 em pacientes de um hospital na Holanda, com sintomas de gastroenterite, sugerindo uma possível relação desta doença com esses agentes.

Apesar dos numerosos relatos da presença de PBV em amostras fecais de vertebrados, a sua patogenia permanece obscura e requer estudos mais aprofundados e detalhados.

1.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico das enterites de origem viral é feito por várias metodologias, descritas na literatura, tais como testes sorológicos, microscopia eletrônica, EGPA e isolamento viral, no entanto, com algumas limitações referentes a sua implementação como método de diagnóstico na rotina laboratorial. A microscopia eletrônica apresenta baixa sensibilidade e não possibilita a análise de grande volume de amostras. O isolamento viral é uma técnica demorada e muitas vezes permite o crescimento de outros agentes presentes nas fezes em detrimento de outros mais exigentes. Contudo, há poucos testes sorológicos e ensaios imuno enzimáticos desenvolvidos, especificamente, para o agente viral investigado neste estudo (KOCI; SEAL; SCHULTZ-CHERRY, 2000; BELLO, 2010).

Nas últimas décadas, houve uma evolução dos métodos de biologia molecular, como a Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR), que permitiu desvendar o genoma da maioria dos micro-organismos e com isto surgiram técnicas que agilizam o diagnóstico de diferentes agentes infecciosos. Assim, os vírus entéricos passaram a ser estudados com maior frequência (KOCI; SEAL; SCHULTZ-CHERRY, 2000; SAIF, 2003; BELLO, 2010).

O diagnóstico da infecção por PBV desempenha um papel central no estabelecimento de medidas de controle e prevenção, sendo que a EGPA e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são as técnicas rotineiras para o seu diagnóstico (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; DHAMA et al. 2009).

1.6.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA)

A EGPA é uma técnica bastante útil no diagnóstico de vírus segmentados, como o PBV, sendo eficaz na detecção dos segmentos genômicos e para a caracterização do perfil eletroforético deste vírus, pois permite a separação dos dois segmentos genômicos de RNAfd de acordo com o tamanho que eles apresentam. No entanto, necessita de altos títulos de excreção viral para a visualização do genoma (PEREIRA et al., 1988a; NATES; GATTI; LUDERT, 2011; MACEDO, 2014).

Esta técnica mostra diferentes mobilidades eletroforéticas nas amostras, pois caracteriza os perfis curto e longo de PBV, sendo utilizados genomas de estirpes

padrão, geralmente estirpes de Rotavírus, como marcadores moleculares em géis de poliacrilamida (GHOSH et al., 2009; MACEDO, 2014).

1.6.2 Reação em Cadeia mediada pela Polimerase precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR).

Atualmente, técnicas de biologia molecular para a detecção do genoma viral são largamente utilizadas para o diagnóstico dos PBV. A PCR é uma técnica vantajosa, como um procedimento rápido, descrito na prática por diversos autores, detecta múltiplos vírus na mesma amostra, permite a análise de várias amostras ao mesmo tempo, com custo relativamente baixo, além de desvendar o genoma de diversos micro-organismos (SAIF Y.M., 2003; BELLO, 2010).

Por meio da PCR o RNAm é utilizado como molde para a síntese da cópia de DNA (cDNA), através de uma reação de PCR padrão. A PCR não exige a viabilidade da partícula viral, pois a análise é feita pela amplificação do genoma, minimizando os problemas ocasionados por falhas na conservação das amostras fecais que diminuem a detecção, por promoverem a degradação das proteínas virais (KANG et al., 2004; PANG et al., 2004; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Para a detecção de PBV utiliza-se a RT-PCR, uma variante da técnica de PCR, por se tratar de um vírus de RNA, sendo necessário fazer a transcrição da fita de RNA para DNA, reação esta mediada pela enzima Transcriptase Reversa (RT), a fim de dar seguimento na PCR (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Há dois pares de oligonucleotídeos (primers) disponíveis para detectar e diferenciar os dois genogrupos, tendo como alvo o gene RdRp, que têm sido utilizados mundialmente para a identificação dos genogrupos 1 e 2 e validar vários estudos em diferentes espécies hospedeiras de PBV (ROSEN et al., 2000; MARTINEZ et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2006; GHOSH et al., 2009; FREGOLENTE et al., 2009; GANESH et al., 2010). Estes primers foram desenvolvidos com base nos protótipos de PBV1 (1-CHN-97) e PBV2 (4-GA-91), isolados na China e Estados Unidos, respectivamente (ROSEN et al., 2000).

1.6.3 Sequenciamento gênico

O sequenciamento é uma ferramenta de diagnóstico para detectar e identificar vários agentes patogênicos, desempenhando um papel importante na caracterização dos vírus, estudos epidemiológicos e descoberta de novos vírus. Consiste em uma série de métodos bioquímicos, que tem como finalidade determinar a ordem das bases nitrogenadas da molécula de DNA em estudo, favorecendo a análise comparativa entre as sequências nucleotídicas de diferentes espécies animais, propiciando maior conhecimento sobre a diversidade genética destas espécies e compreensão da patogênese e do surgimento de novas cepas virais (DARNELL; LODISH; BALTIMORE, 2000; GHOSH et al., 2009).

Na década de 70 e 80 foram criados os primeiros métodos de sequenciamento, o de Maxam-Gilbert, conhecido como método de clivagem química e o método de terminação em cadeia de Sanger, sendo considerados como os métodos de primeira geração. O Projeto Genoma Humano propiciou o desenvolvimento de métodos mais avançados, tanto para geração dos dados quanto para análise destes, no entanto as taxas de erros associadas se apresentaram mais elevadas, com leituras mais curtas quando comparadas com o método de Sanger, contudo os métodos mais modernos não se limitam a analisar pequenos fragmentos de DNA, analisando milhões deles em uma única corrida, permitindo um sequenciamento mais eficiente, com maior cobertura, de até genomas inteiros, em uma única reação (PINTO L.S; KREMER F.S, 2016; BORGES et al., 218).

Os métodos de nova geração, incluem os métodos de Pirosequenciamento (segunda geração) e o de Sequenciamento de DNA de molécula única em tempo real (Single-molecule, Real time DNA Sequence - SMRT), de terceira geração. O Pirosequenciamento é considerado mais eficiente que o método de Sanger, com cobertura da sequência maior e leitura repetida das bases, permitindo uma maior especificidade. Suas aplicações são: Análise de polimorfismo de nucleotídeo; Identificação de bactérias; Tipagem fúngica e viral; Detectar mutações; Permite análise de metilação do DNA; Análise de sequências múltiplas; Verificações de clones e sequenciamento do genoma Humano. Como vantagens temos: Automação; Expediente (1 dia); Alto rendimento; Comprimento das sequências maior de 200 pb; Ilimitado número de amostras; Pode gerar o sinal de sequenciamento imediatamente a partir do primer, no entanto utiliza um número elevado de reagentes, sendo mais

dispendioso; necessita pesada bioinformática, com relativa alta taxa de erro (0,0098). O SMRT é um método de síntese em tempo real, pode ser utilizado para o sequenciamento completo de vírus e bactérias e mudanças epigenéticas (metilações de DNA), por este método é possível realizar leituras de comprimento longo (até 20 kpb), com precisão de 99,999%, com alta qualidade de sequenciamento, diminuindo gastos com outras análises como a clonagem, permitindo análises rápidas (2 horas), porém possui alto custo no equipamento e medições, além de requerer altas massas de DNA (1µg) (PINTO L.S; KREMER F.S, 2016; BORGES et al., 2018).

A determinação da primeira sequência completa dos dois segmentos de PBV foi realizada em 2005, em uma criança com gastroenterite aguda, na Tailândia (WAKUDA et al., 2005). A informação genômica crescente de PBV têm contribuído para o conhecimento deste vírus em nível molecular, auxiliando na avaliação da transmissão interespecífica destes vírus (BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; GANESH et al., 2010; GIORDANO et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA

O Brasil é o segundo maior produtor e maior exportador de carne de frango e para manter essa posição de destaque no setor avícola, o controle de microorganismos causadores de patologias nesses animais é fundamental. Dentre essas patologias citam-se as gastroenterites, que comprometem de forma significativa a produção desses animais, seja por queda na produção ou até mesmo mortalidade. Com isso o conhecimento dessas patologias contribuirá de forma significativa para a tomada de medidas preventivas, paliativas e curativas nesses (ABPA, 2017; AVISITE, 2018).

Vários estudos de detecção de PBV foram descritos em amostras infecciosas de diversas espécies de mamíferos e répteis incluindo seres humanos, roedores, bovinos, suínos, equinos, lapinos, caninos e símios (LUDERT et al., 1995, HAGA et al., 1999, BUZINARO et al., 2003, MASACHESSI et al., 2007, CARRUYO et al., 2008, FREGOLANTE et al., 2009, GANESH et al., 2011b; MALIK et al., 2011, WANG et al., 2012, MALIK et al., 2014a). Em espécies de aves, o PBV 1 foi detectado por diversos autores (ALFIERI et al., 1988; LEITE et al., 1990; TAMEHIRO et al., 2003; MASACHESSI et al., 2007; DAY; ZSAC, 2010; SILVA et al., 2014). No entanto, em relação à detecção molecular de PBV2 a partir de aves de corte, não há estudos publicados até o momento.

O PBV é considerado patógeno emergente e oportunista em casos de diarreia, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (GONZÁLEZ et al., 1998; GIORDANO et al., 1999; ROSEN et al., 2000; MARTÍNEZ et al., 2003). Além disso, após a comparação das sequências nucleotídicas de PBV identificadas em humanos e animais, também foi sugerido o potencial zoonótico desses vírus (GANESH et al., 2010). A detecção de PBV nas fezes de mamíferos diarreicos e saudáveis, de animais domésticos e de uma grande variedade de aves selvagens, além de animais de jardim zoológico e águas residuais têm aumentado a preocupação com os aspectos de saúde pública relacionados com a transmissão deste vírus. De forma semelhante, a detecção de PBV geneticamente relacionados encontrados em seres humanos e hospedeiros suínos tem aumentado a preocupação em relação à sua potencial transmissão zoonótica.

Estudos sobre a detecção de PBV 2, a partir de amostras fecais de aves são escassos. Com isso, esta pesquisa poderá contribuir para avaliar a circulação deste genogrupo nesses animais, auxiliando na epidemiologia deste agente, visto que as aves também são suscetíveis à infecção por PBV, além de proporcionar a ampliação do conhecimento da diversidade genética e do potencial zoonótico deste vírus.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a presença do Picobirnavírus Genogrupo 2 em amostras de fezes de aves de corte da mesorregião metropolitana de Belém/Pa, no período compreendido de 2008 a 2011.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a frequência de PBV2 em espécimes fecais de aves de corte da Mesorregião estudada e nos municípios desta;
- Evidenciar a presença dos dois genogrupos de PBV nas amostras estudadas;
- Avaliar a frequência do PBV2 em diferentes faixas etárias de aves da mesorregião estudada;
- Identificar o perfil eletroforético das amostras positivas para PBV2;
- Realizar a análise filogenética, comparando as sequências de nucleotídeos e aminoácidos com aquelas disponíveis em banco de genes.

4 APRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA A SER EMPREGADA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

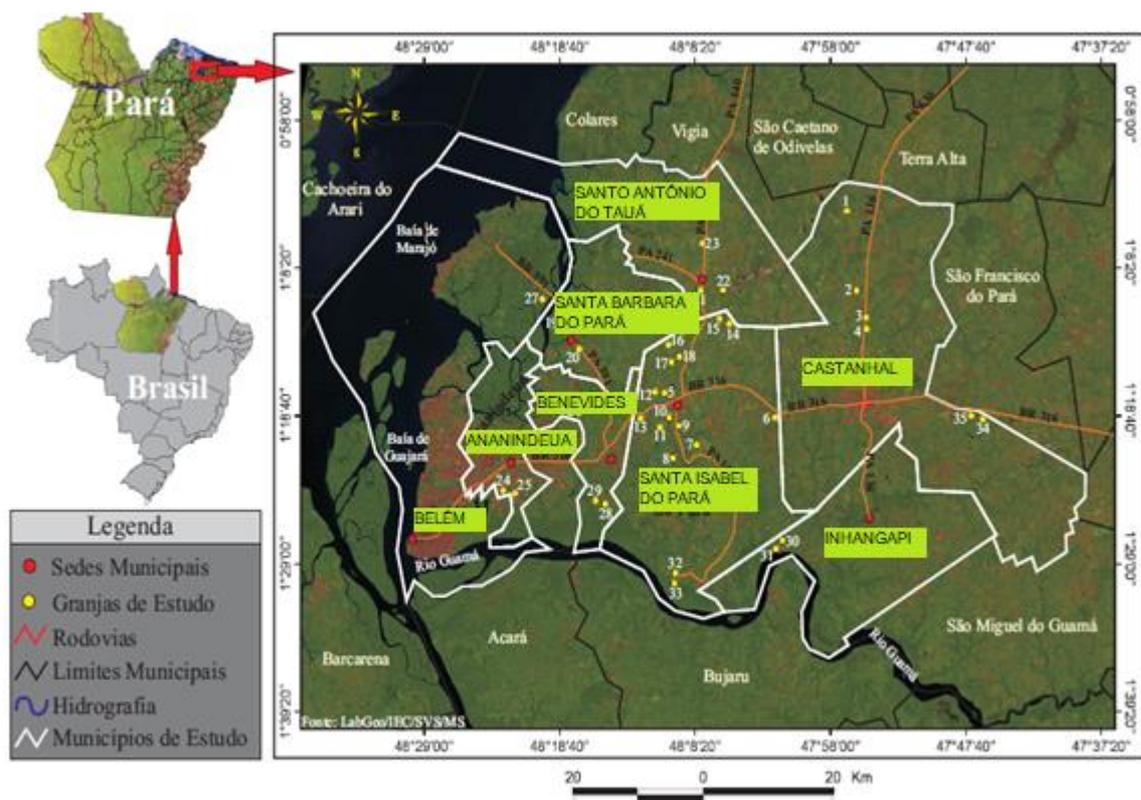
O uso das amostras fecais que foram utilizadas neste trabalho foi autorizado pelo Instituto Evandro Chagas (IEC) (ANEXO 1) e pertencem ao trabalho intitulado **Detecção, Epidemiologia e Análise Molecular de Rotavírus, Picobirnavírus e Reovírus em Aves de Corte Criadas em Granjas na Mesorregião Metropolitana de Belém, Pará, Brasil**, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas CEUA/IEC, sob certificado de nº 0004/2007.

Os procedimentos técnicos de manipulação das amostras, tais como: Preparo das suspensões fecais obtidas das aves; Extração do RNA, que viabiliza a pesquisa de PBV, foram realizados em cabine de segurança biológica classe 2. Os resíduos das alíquotas das amostras utilizadas para confecção das suspensões foram acondicionados em caixa para descarte de material contaminado e enviados para o incinerador do Instituto Evandro Chagas (IEC), onde foram descartados. As amostras colhidas e cepas obtidas foram armazenadas em freezer a -70°C e ficam sob responsabilidade do IEC.

4.2 ÁREA DO ESTUDO

A área de escolha para o desenvolvimento desta pesquisa foi a Mesorregião Metropolitana de Belém Pará, composta por onze municípios (Ananindeua, Barcarena, Belém, Benevides, Bujaru, Castanhal, Inhangapi, Marituba, Santa Isabel do Pará, Santa Bárbara do Pará e Santo Antônio do Tauá) com grande proximidade da capital (Belém) e da base de processamento dos materiais (Ananindeua). Destes, oito municípios (Belém, Ananindeua, Benevides, Castanhal, Santa Isabel do Pará, Inhangapi, Santa Bárbara do Pará e Santo Antônio do Tauá) foram selecionados para a realização do estudo, no período compreendido entre outubro de 2008 a maio de 2011 (Figura 7).

Figura 7 - Municípios em que foram realizadas as colheitas das amostras.



Fonte: Laboratório de Geoprocessamento do Instituto Evandro Chagas (LabGeo/IEC/SVS/MS, 2012; SILVA, 2012).

4.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

A colheita das amostras foi realizada a partir do material fecal de espécies de aves do gênero *Gallus*, provenientes de 37 granjas distribuídas em 8 municípios da Mesorregião Metropolitana de Belém, considerando a frequência de positividade observada em granjas na literatura. As granjas foram escolhidas segundo a disponibilidade das integradoras participantes e o número de espécimes fecais colhidos foi de acordo com a distribuição das granjas por município (SILVA, 2012).

Foram colhidos 85 *pools* de material fecal (amostras fecais depositadas sobre as camas) pertencentes a nove pontos distintos de cada aviário, escolhidos aleatoriamente. Por conveniência, cada pool de amostras colhido recebeu a denominação de “amostra”, sendo representativa da população daquele lote de acordo com o realizado por TAMEHIRO et al. (2003). As colheitas foram realizadas em no mínimo 30% dos galpões, em nove pontos distintos de cada galpão, o qual foi visitado apenas uma vez (SILVA, 2012). Todas as amostras colhidas foram agrupadas por município e em três faixas etárias (1-2 semanas; 3-4 semanas e 5-6 semanas) (Quadro 3).

Quadro 3 – Quantidade de amostras colhidas por Município e classificadas por faixas etárias.

MUNICÍPIO	N° AMOSTRAS COLHIDAS	IDADE (SEMANAS)		
		1 - 2	3 - 4	5 - 6
Ananindeua	7	3	0	4
Belém	5	0	2	3
Benevides	12	2	3	7
Castanhal	12	0	7	5
Inhangapi	7	0	7	0
Santa Bárbara	4	0	1	3
Santa Izabel	34	4	16	14
Santo Antônio do Tauá	4	1	1	2
TOTAL	85	10	37	38

Após a colheita, as amostras foram mantidas sob refrigeração em recipientes estéreis até sua chegada à Seção de Virologia (Laboratório de Rotavírus) do IEC,

onde foram mantidas a -70°C até seu processamento. No ato da colheita, informações sobre a idade, presença de doenças, além de outras informações das aves foram coletadas (SILVA, 2012).

4.4 PREPARO DA SUSPENSÃO FECAL

Foram preparadas suspensões fecais a 20% em tampão Tris-HCl/CaCl₂, pH 7,2 (APÊNDICE 1) e clarificadas por centrifugação a 5000 xg por 10 minutos a 4°C . Em seguida, foram coletados os sobrenadantes e armazenados a -70°C para a posterior utilização na extração e detecção do material genético viral, conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8 – Representação do preparo da suspensão fecal.

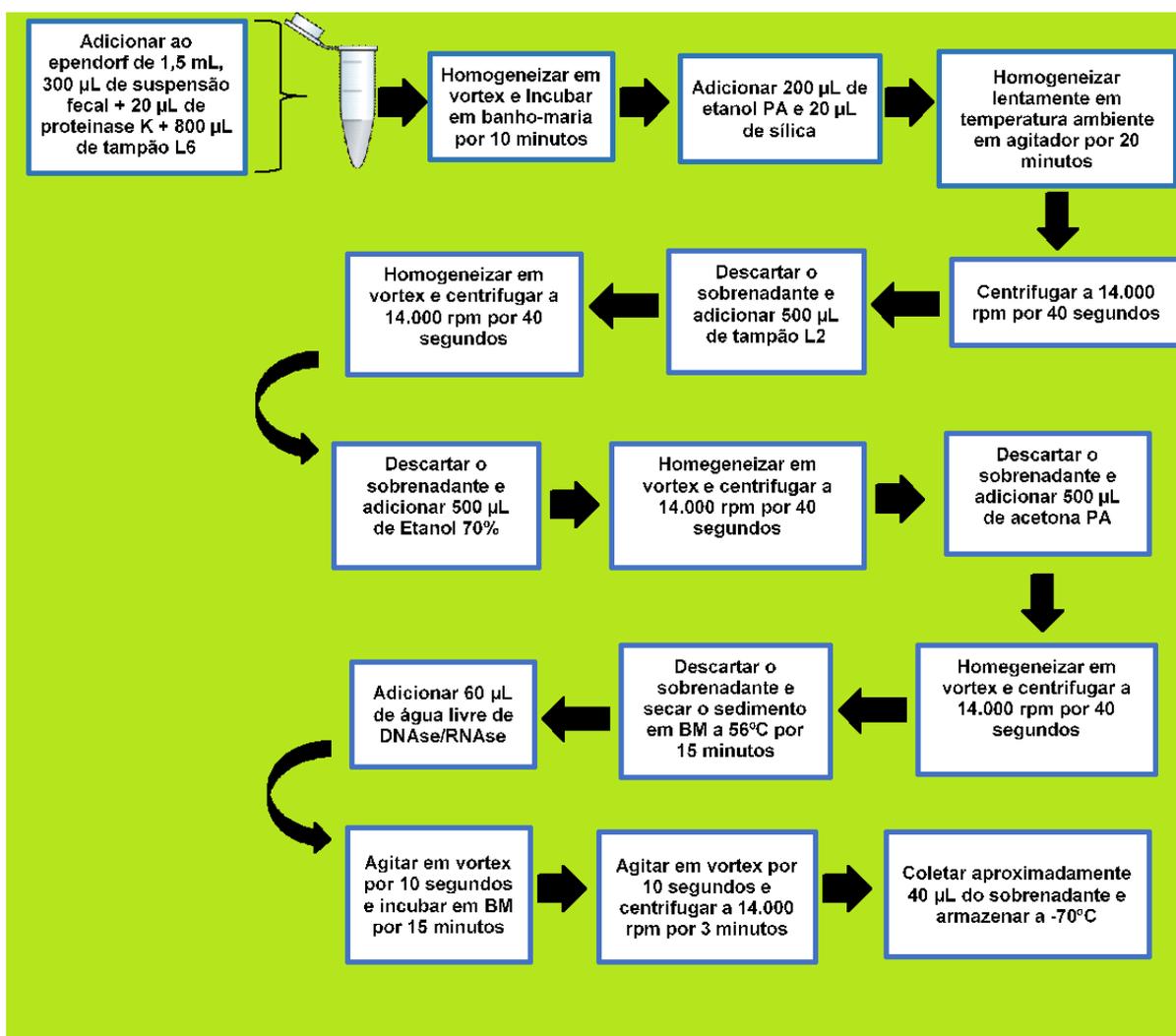


Fonte: Adaptado de SILVA, (2012).

4.5 EXTRAÇÃO DO ÁCIDO NUCLEICO VIRAL (RNA)

O genoma viral foi extraído a partir das suspensões fecais de acordo com o método descrito por Boom et al. (1990), representado na Figura 9. O preparo dos reagentes utilizados na extração está ilustrado no APÊNDICE 2.

Figura 9 – Representação esquemática da extração do genoma viral.



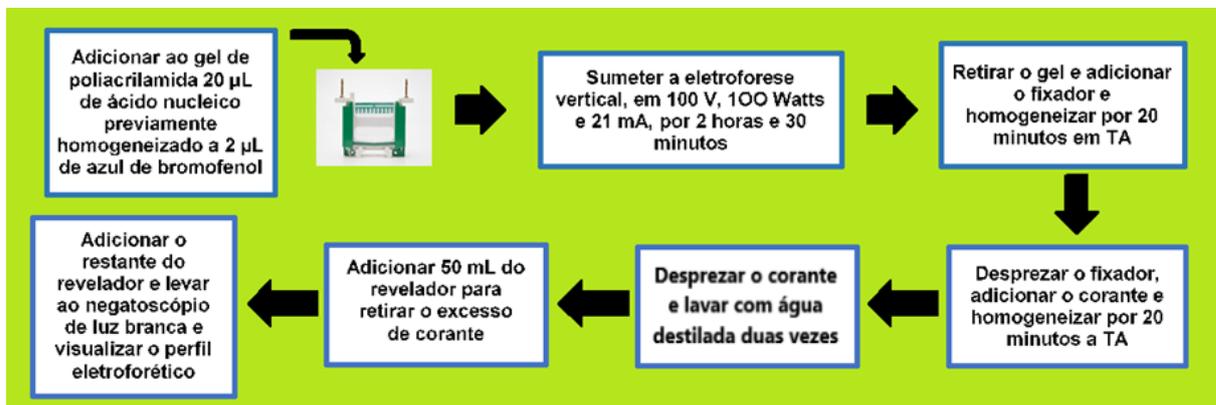
Fonte: Adaptado de SILVA (2012). BM: Banho-Maria.

Durante o processo de extração, todas as medidas de controle de qualidade e validação foram adotadas, incluindo a utilização de controle positivo (amostra positiva para PBV2) e negativo (água ultra pura), além de um controle positivo para PBV1, como controle da reação.

4.6 ANÁLISE POR EGPA PARA CARACTERIZAÇÃO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE PBV

Todas as amostras utilizadas neste trabalho foram testadas, anteriormente, por EGPA, no estudo de Silva (2012), onde foi caracterizado o perfil eletroforético do PBV nessas amostras. Na presente pesquisa, foram retestadas em EGPA somente as amostras positivas, por RT-PCR para PBV2, a fim de verificar o perfil eletroforético (longo ou curto) de PBV e correlacionar com os dados da literatura. A técnica de EGPA foi realizada de acordo com Pereira et al. (1983) (Figura 10) e o preparo dos reagentes foi realizado segundo o descrito no APÊNDICE 3.

Figura 10 – Representação da técnica de EGPA.



V: Volts; mA: Mili-Amperes; TA: Temperatura Ambiente.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR).

A técnica de RT-PCR foi realizada com iniciadores moleculares específicos para o gene RdRp de Picobirnavírus do genogrupo 2, conforme demonstrado no Quadro 4. Esta técnica é constituída de três etapas, sendo a primeira direcionada à desnaturação do RNA, a fim de separá-las; a segunda etapa consiste no anelamento ou hibridização, com intuito de ligação dos iniciadores ou oligonucleotídeos com a fita de cópia de DNA (cDNA), do produto que se quer obter, intermediado de transcrição reversa; a terceira etapa consiste na extensão e pareamento dos pares de base, com intuito de amplificar o material genético (cDNA) do agente pesquisado, de acordo com protocolo específico (SNUSTAD; SIMONS, 2008; ALBERTS et al., 2011).

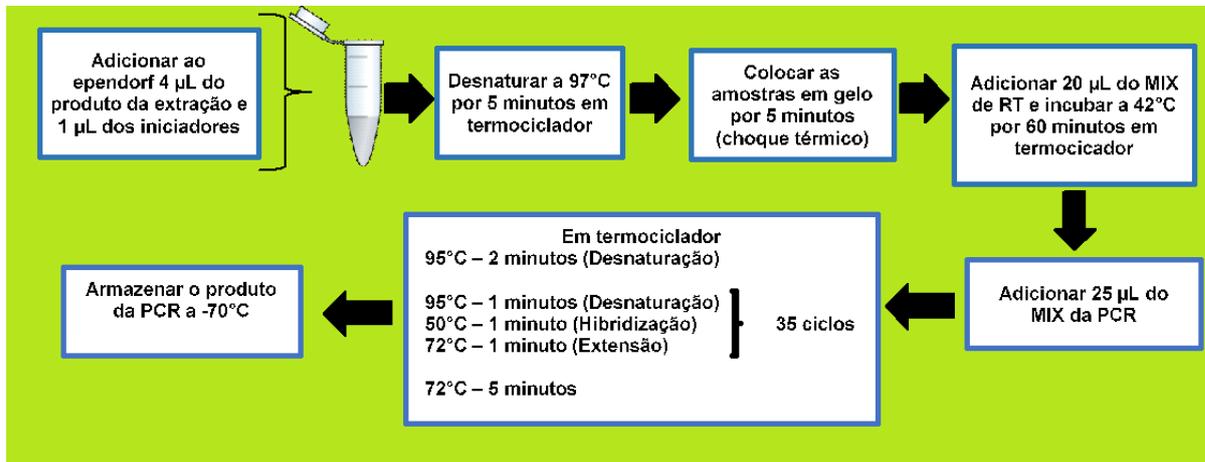
Quadro 4. Sequências dos iniciadores para detecção do Genogrupo 2 de PBV por RT-PCR.

Identificação dos Iniciadores	Concentração iniciadores	Posição (Nucleotídeo)	Amplicon (pb)	Sequência (5' – 3')	Genogrupo
PicoB23+	20 nM	685 - 699	369	CGG TAT GGA TGT TTC	2
PicoB24-	20 nM	1039 – 1053		AAG CGA GCC CAT GTA	

Fonte: Rosen et al. (2000). + = forward, - = reverse

A reação de PCR foi realizada conforme a representação esquemática descrita na Figura 11, de acordo com protocolo adaptado de Rosen et al. (2000). Os reagentes utilizados na reação de PCR foram preparados de acordo com o APÊNDICE 4.

Figura 11 – Representação esquemática da Técnica de RT-PCR.

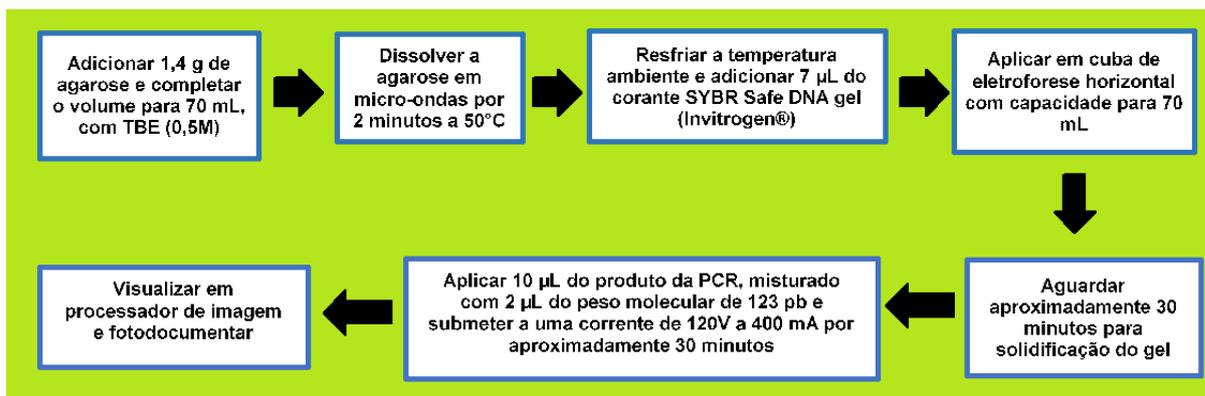


RT: Transcriptase Reversa; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase.

4.8 ANÁLISE EM GEL DE AGAROSE

Após a reação de PCR, o produto foi aplicado em gel de agarose a 2%, de acordo com representação esquemática da Figura 12 e visualizado em processador de imagem GEL DOC 1000.

Figura 12 – Representação esquemática da técnica de preparo do gel de Agarose a 2% e visualização dos fragmentos de DNA.



TBE: Tampão Tris Base; pb: Pares de Base; V: Volts; mA: Mili-Amper.

4.9 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO

Para dar início ao sequenciamento, o produto da PCR foi purificado utilizando o Kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante.

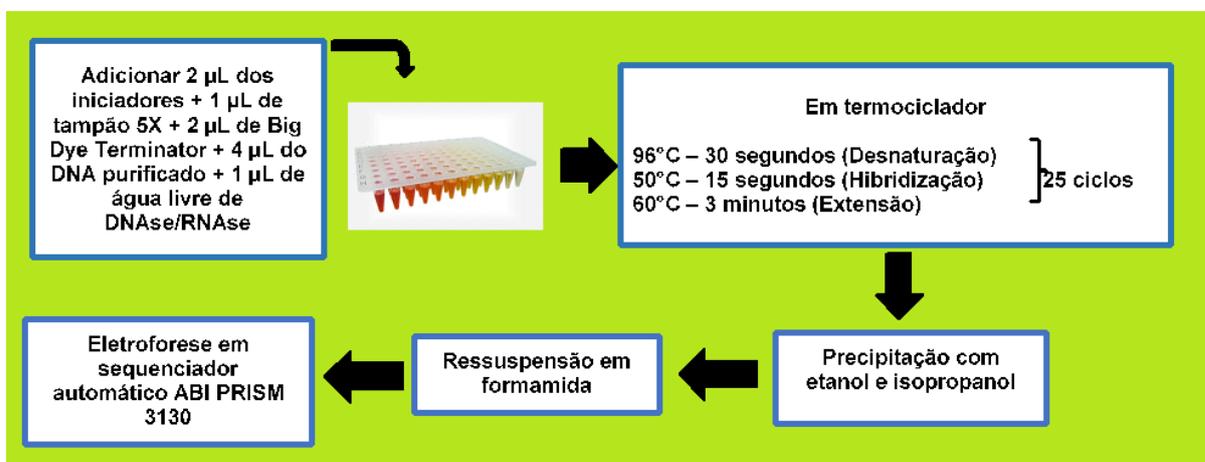
Após a purificação do DNA foi realizada a sua quantificação, sendo submetido à eletroforese em gel de agarose, como citado no item anterior. A quantificação do DNA foi feita pela comparação dos amplicons com peso molecular Low DNA Mass Leader (Invitrogen®) e sua concentração foi expressa em nanogramas (ng) de acordo com a intensidade das bandas. A estimativa da concentração do produto foi obtida pela intensidade das bandas no gel de agarose.

4.10 SEQUENCIAMENTO GÊNICO

Com o produto purificado foi realizada a reação de sequenciamento de nucleotídeos com os mesmos iniciadores específicos para PBV2 utilizados na RT-PCR.

A técnica de sequenciamento foi realizada de acordo com o método de Sanger; Nicklen; Coulson (1977), utilizando o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems®), seguindo o protocolo do fabricante, utilizando o sequenciador automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). O esquema desta técnica está descrito na Figura 13.

Figura 13 – Representação da técnica de Sequenciamento.



4.11 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Após a obtenção das sequências nucleotídicas, as mesmas foram analisadas utilizando o programa Geneious 10.0.7 (KEARSE et al., 2012), sendo comparadas com sequências de Picobirnavírus depositadas no banco de dados GenBank/NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), usando o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 2009), para identificação do genótipo viral e obtenção da sequência consenso pelo método de assemble “*mapping to reference*”. Foi utilizada amostra do genogrupo 1 como “outgroup”, a fim de visualizar a diferença entre os genogrupos de PBV. As sequências utilizadas para comparação estão no Quadro 5.

As sequências foram alinhadas utilizando o programa Mafft versão 7 (KATOH; STANDLEY, 2013), implementado dentro do programa Aliview versão 1.17.1 (LARSSON, 2014). Para o cálculo da similaridade nucleotídica foi utilizado o MEGA versão 6.0 (TAMURA et al., 2013).

Quadro 5 – Amostras de PBV2 utilizadas para comparação com as amostras positivas deste estudo.

AMOSTRA	ESPÉCIE	PAÍS	ANO	Nº ACESSO
Genogrupo 2				
HK-2014	Aves	Coréia	2014	KM254165.1
CHHN-A5	Suíno	China	2014	KC841459.1
207	Suíno	Índia	2014	KP868555.1
GPBV6G2	Humano	Índia	2011	AB517738.1
GPBV6G2P	Humano	Índia	2011	AB526257.1
HP	Bovino	Índia	2012	JX411965.1
VS4400028	Suíno	China e Sri Lanka	2011	JN176313.1
CHHN-A	Suíno	China	2014	KC841468.1
VS4400041	Suíno	China e Sri Lanka	2011	JN176314.1
196-06	Primata não Humano	EUA	2015	KY174983.1
Genogrupo 1				
PTN	Bovino	Índia	2011	JX310441
PTN	Bovino	Índia	2009	JX310440
MN-1	Ave	EUA	2011	KJ495690

Para confecção das árvores filogenéticas foi aplicado o método de máxima verossimilhança (maximum likelihood- ML) pelo programa IQ-Tree (NGUYEN et al., 2014), com 1000 réplicas de *bootstrap* para dar confiabilidade aos grupamentos filogenéticos (FELSENSTEIN, 1985).

4.12 DETECÇÃO DE PBV1 E PBV2

As amostras positivas para PBV2 por RT-PCR neste estudo foram correlacionadas quanto a presença de PBV1, visto que as amostras estudadas neste trabalho foram as mesmas utilizadas na pesquisa de SILVA (2012), as quais foram detectadas para a presença do genogrupo 1.

4.13 MÉTODO ESTATÍSTICO

A análise estatística das variáveis das amostras foi realizada por uma variável categórica, onde verificou-se a presença ou ausência do agente em questão, utilizando o teste G, adotando o nível de significância de 5%, com o programa Biostat 5.0.

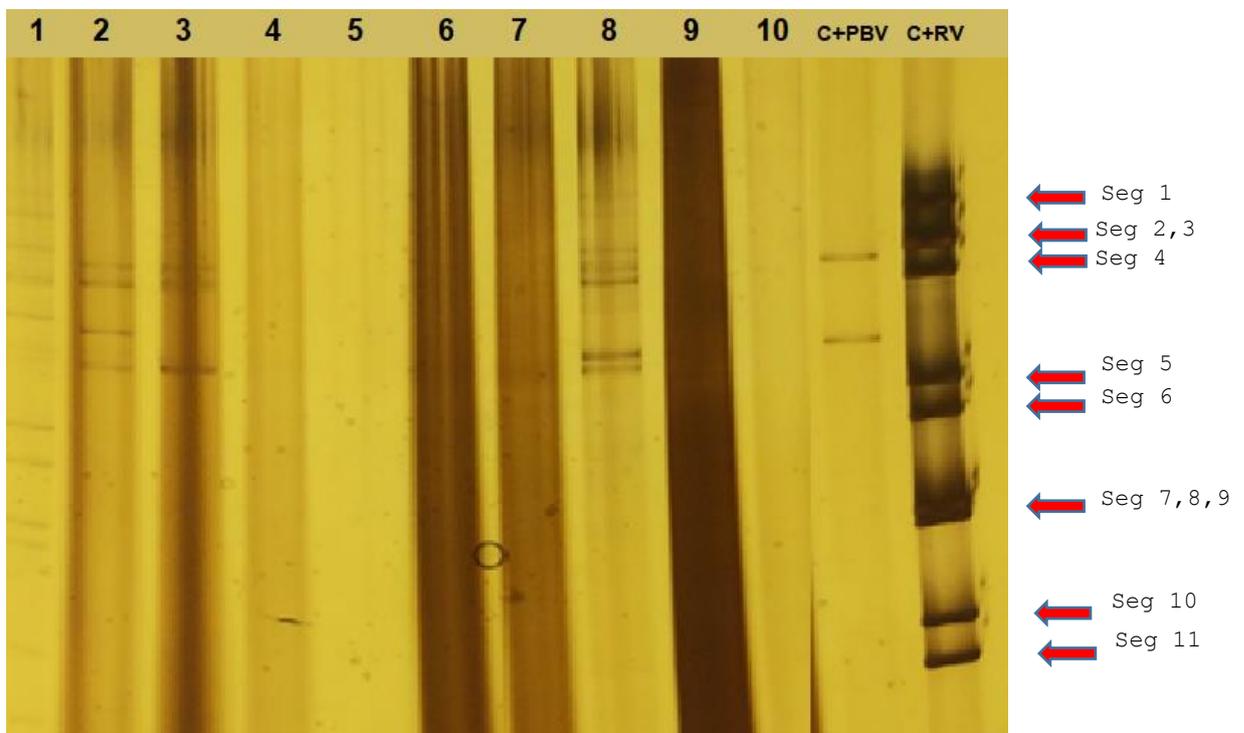
Foi realizada a análise para verificar a significância da distribuição de positividade entre as faixas etárias e municípios, a fim de verificar a dependência entre as variáveis.

5 – RESULTADOS

5.1 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA)

As amostras positivas para PBV2 na RT-PCR foram retestadas pela EGPA, sendo que 3 (30%) apresentaram perfil condizente com PBV, demonstrando somente a presença do perfil eletroforético longo, como demonstrado na Figura 14.

Figura 14 – Perfil eletroforético do PBV por EGPA.

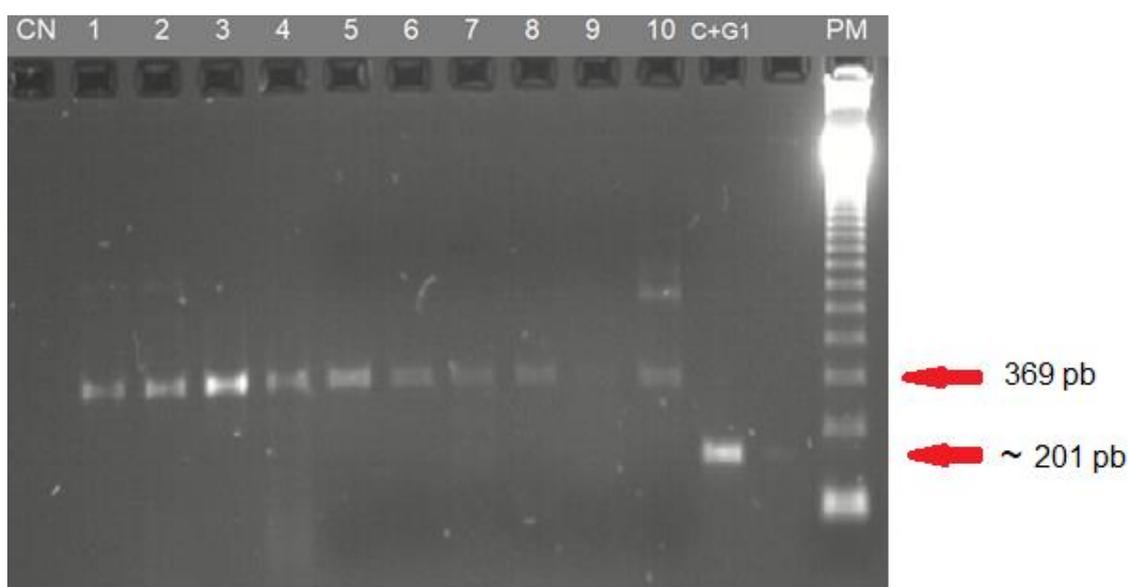


1=AVE45 - Amostra positiva para Reovírus; 2=AVE52, 3=AVE54 e 8=AVE70 - Amostras positivas para Picobirnavirus; 4=AVE62, 5=AVE63, 6=AVE64, 7=AVE65, 9=AVE84, 10=AVE98 - Amostras negativas; C+PBV - Padrão Positivo para Picobirnavírus perfil longo; C+RV - Padrão positivo para Rotavírus do grupo A.

5.2 – REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-PCR).

Foram testadas 85 amostras de pool de fezes de aves, sendo que destas 10 (11,76%) apresentaram positividade na técnica de RT-PCR para o genogrupo 2 de PBV (Figura 15).

Figura 15 – Amostras positivas por RT- PCR para Picobirnavírus Genogrupo 2.



CN - Controle Negativo; 1=AVE45, 2=AVE52, 3=AVE54, 4=AVE62, 5=AVE63, 6=AVE64, 7=AVE65, 8=AVE70, 9=AVE84 e 10=AVE98 - Amostras positivas para Picobirnavírus Genogrupo 2 colhidas neste estudo; C+G1 - Controle positivo de Picobirnavírus Genogrupo 1; PM - Peso Molecular de 123pb.

Em relação à detecção de PBV2 nas granjas, oito (21,62%) das 37 granjas apresentaram positividade para o vírus.

A presença de infecções mistas pelos dois genogrupos de PBV foi detectada em 3 (30%) das 10 amostras positivas para PBV2 na RT-PCR, quando comparadas com os resultados obtidos por Silva (2012), utilizando as mesmas amostras (Quadro 6).

Quadro 6 – Demonstrativo das amostras com infecção mista por PBV por RT-PCR.

AMOSTRA	PBV1+	PBV2+	PBV1 + PBV2
AVE45	-	+	-
AVE52	+	+	+
AVE54	+	+	+
AVE62	-	+	-
AVE63	+	+	+
AVE64	-	+	-
AVE65	-	+	-
AVE70	-	+	-
AVE84	-	+	-
AVE98	-	+	-

O PBV2 foi detectado somente nos municípios de Castanhal, Benevides, Santa Barbara e Santa Isabel, encontrando-se a maior frequência em Santa Bárbara (Tabela 1). Na análise estatística não foi verificada associação entre os municípios, ou seja, não houve diferença significativa entre os municípios com positividade para PBV2 ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Detecção de PBV2 por RT-PCR, em oito municípios da mesorregião metropolitana de Belém.

Municípios	N° Amostras	N° Amostras Testadas	PBV2 Positivo
Ananindeua	7	7	0 (0%)
Belém	5	5	0 (0%)
Benevides	12	12	2 (16,67%)
Castanhal	12	12	1 (8,33%)
Inhangapi	7	7	0 (0%)
Santa Bárbara	4	4	1 (25%)
Santa Isabel	34	34	6 (17,64%)
Santo Antônio do Tauá	4	4	0 (0%)
Total	85	85	10 (11,76%)

PBV2 = Picobirnavírus genogrupo 2.

Foram testadas amostras de frangos entre 1 a 6 semanas de idade, encontrando-se positividade para PBV2 somente nas faixas etárias compreendidas entre 3-4 semanas e 5-6 semanas, com maior frequência observada na faixa etária de 5-6 semanas (Tabela 2). Observaram-se diferenças significativas entre as faixas etárias de 1 a 2 semanas e 5 e 6 semanas ($p < 0,05$).

Tabela 2 – Detecção de PBV2 em frangos por faixa etária.

Idade	Amostras Colhidas	Amostras Testadas	PBV2 Positivo
1 - 2 semanas	11	11	0 (0%)
3 - 4 semanas	37	37	3 (8,10%)
5 - 6 semanas	37	37	7 (18,91%)
Total	85	85	10 (11,76%)

PBV2 = Picobirnavírus genogrupo 2

5.3 SEQUENCIAMENTO GÊNICO

Todas as amostras positivas na RT-PCR foram sequenciadas e suas sequências alinhadas com PBV de diferentes espécies. Das 10 amostras submetidas ao sequenciamento, 7 apresentaram sequências com qualidade satisfatória, sendo submetidas à análise dos genes para construção da árvore filogenética e depositadas na base de dados (GenBank), com número de acessos: MH795822; MH795823; MH795824; MH795825; MH795826; MH795827; MH795828.

As análises incluíram fragmentos de ~363pb correspondendo aos nt 750 -1115, usando como referência o gene RdRp do protótipo 196-06, obtido a partir de primata não humanos de um estudo nos Estados Unidos, com número de acesso KY174983.1.

A similaridade nucleotídica e aminoacídica entre as amostras deste estudo variou de 91% a 99% e 92% a 98%, respectivamente, conforme demonstrado nos Quadros 7 e 8

Quadro 7 – Análise da similaridade nucleotídica entre as amostras de PBV2 deste estudo.

PBV	AMOSTRA	AVE45	AVE52	AVE54	AVE63	AVE70	AVE84	AVE98
G2	AVE45	-	93%	92%	98%	99%	97%	93%
	AVE52	93%	-	99%	92%	92%	92%	94%
	AVE54	92%	99%	-	92%	91%	92%	94%
	AVE63	98%	92%	92%	-	97%	96%	92%
	AVE70	99%	92%	91%	97%	-	97%	93%
	AVE84	97%	92%	92%	96%	97%	-	91%
	AVE98	93%	94%	94%	92%	93%	91%	-

Em azul estão indicadas as amostras com maior similaridade e em vermelho as que apresentam a menor similaridade nucleotídica.

Quadro 8 – Análise da similaridade de aminoácido entre as amostras de PBV2 deste estudo.

PBV	AMOSTRA	AVE45	AVE52	AVE54	AVE63	AVE70	AVE84	AVE98
G2	AVE45	-	93%	92%	98%	98%	97%	95%
	AVE52	97%	-	97%	94%	93%	94%	95%
	AVE54	92%	97%	-	93%	92%	94%	94%
	AVE63	98%	94%	93%	-	96%	96%	95%
	AVE70	98%	93%	92%	96%	-	98%	95%
	AVE84	97%	94%	94%	96%	98%	-	94%
	AVE98	95%	95%	94%	95%	95%	94%	-

Em azul estão indicadas as amostras com maior similaridade e em vermelho as que apresentam a menor similaridade aminoacídica.

A análise das sequências para o Gene RdRp deste estudo foram comparadas as outras sequências do banco de dados, variando de 39% a 93% para nucleotídeos e 24% a 98% para aminoácidos (Quadros 9 e 10) apresentando maior similaridade nucleotídica (89% a 93%) e aminoacídica (90% a 98%) com o protótipo de aves HK-2014, de um estudo da Coréia. Esta amostra pertence ao gênero *Picobirnavirus*, porém não está classificada em um dos genogrupos de PBV na base de dados.

Quadro 9 – Análise da similaridade de nucleotídeo entre amostras de PBV2 desse estudo e outros da literatura.

PBV	AMOSTRA	AVE45	AVE52	AVE54	AVE63	AVE70	AVE84	AVE98
	HK-2014	90%	90%	90%	90%	89%	89%	93%
G2	CHHN-A5	64%	66%	63%	66%	61%	62%	65%
	207	65%	65%	63%	65%	64%	63%	65%
	GPBV6G2	65%	65%	63%	63%	63%	63%	64%
	GPBV6G2P	63%	63%	63%	63%	63%	62%	62%
	HP	63%	62%	61%	63%	62%	61%	62%
	VS4400028	62%	61%	61%	65%	61%	61%	60%
	CHHN-A	64%	66%	63%	62%	61%	62%	64%
	VS4400041	60%	58%	58%	61%	60%	60%	60%
	196-06	49%	40%	42%	47%	41%	39%	40%

Em azul estão indicadas as amostras com maior e em vermelho as que apresentam a menor similaridade nucleotídica, com as amostras deste estudo.

Quadro 10 – Análise da similaridade de aminoácido entre as amostras de PBV2 desse estudo e outros da literatura.

PBV	AMOSTRA	AVE45	AVE52	AVE54	AVE63	AVE70	AVE84	AVE98
	HK-2014	94%	95%	97%	90%	92%	94%	98%
G2	CHHN-A5	73%	69%	66%	73%	64%	66%	68%
	207	68%	66%	65%	68%	63%	64%	65%
	GPBV6G2	68%	67%	65%	68%	62%	63%	66%
	GPBV6G2P	68%	64%	65%	68%	62%	63%	64%
	HP	70%	62%	63%	70%	60%	61%	61%
	VS4400028	68%	65%	65%	68%	63%	64%	65%
	CHHN-A	66%	65%	64%	66%	61%	62%	64%
	VS4400041	66%	61%	61%	66%	61%	62%	61%
	196-06	33%	24%	27%	33%	28%	26%	25%

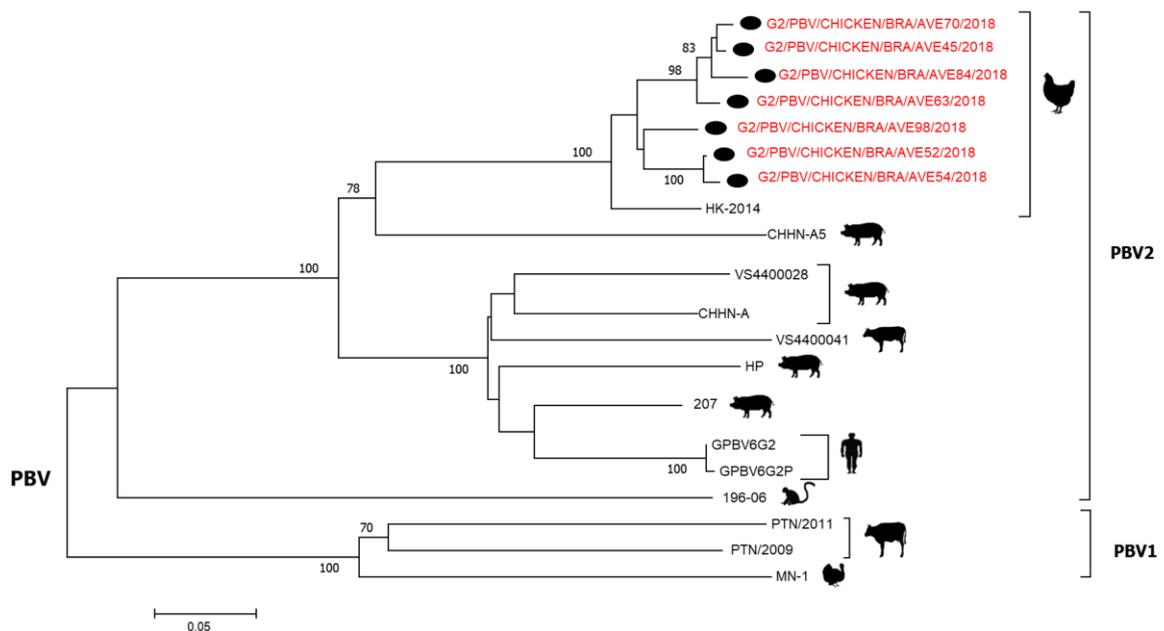
Em azul estão indicadas as amostras com maior e em vermelho as que apresentam a menor similaridade aminoacídica, com as amostras deste estudo.

Os protótipos de PBV2 encontrados neste estudo relacionaram-se especificamente entre si e com a amostra de aves HK-2014 (Figura 16). Analisando a árvore construída, verificou-se que há uma divisão em dois grupos, entre as amostras

positivas para PBV2 deste estudo. No primeiro grupo, encontram-se as amostras AVE70, AVE45, AVE84 e AVE63 com similaridade nucleotídica e aminoacídica variando de 96% a 99% e 96% a 98%, respectivamente, sendo que as amostras AVE70 e AVE45 apresentaram maior similaridade entre si (99% nucleotídica e 98% aminoacídica). Com relação ao segundo grupo, encontram-se as amostras AVE52, AVE54, e AVE98, possuindo similaridade nucleotídica e aminoacídica, com variação de 94% a 99% e 94% a 97%, respectivamente, sendo que as amostras AVE52 e AVE54 apresentaram a maior similaridade entre si (99% nucleotídica e 97% aminoacídica).

Uma relação de maior heterogeneidade foi observada entre as amostras deste estudo com os demais protótipos de PBV2 utilizados na árvore, pertencentes a outras espécies animais, em locais e tipos de amostras distintas, sendo elas: protótipo suíno CHHN-A5; protótipos suíno VS4400028, VS4400041, CHHN-A, 207; protótipo bovino HP; protótipos humano GPBV6G2, GPBV6G2P; protótipo primata não-humano 196-06.

Figura 16 – Árvore Filogenética construída usando o gene RdRp de PBV.



A árvore filogenética foi construída pelo método de máxima verossimilhança (maximum likelihood-ML). Os valores de *bootstrap* acima de 70 (1.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore. A barra de escala é proporcional à distância filogenética. As amostras positivas deste estudo encontram-se marcadas em vermelho. PBV1 = Genogrupo 1 de PBV e PBV2 = Genogrupo 2 de PBV.

6 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado a detecção de Picobirnavírus, em vários países e espécies de animais, com relatos de infecções persistentes ou esporádicas, porém, a maioria desses estudos se refere ao genogrupo 1 de Picobirnavírus, com poucos relatos na literatura em relação ao genogrupo 2, especificamente em aves (BATTACHARYA et al., 2007; BANYAI et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009; VAN LEEUWEN et al., 2010; GANESH et al., 2011a, 2011b; SMITS et al., 2011; GIORDANO et al., 2011; GANESH et al., 2012; MASACHESSI et al., 2012; WANG et al., 2012; MALIK et al., 2014b; SILVA et al., 2014; TAKIUSHI et al., 2016; WILBURN et al., 2016; GALLAGHER et al., 2017).

A detecção por RT-PCR é considerada hoje um dos métodos de escolha para o diagnóstico dos dois genogrupos de PBV, por apresentar alta sensibilidade, quando comparada à EGPA e por utilizar iniciadores (primers) específicos para os dois genogrupos de PBV (BELLO, 2010; GANESH; MASACHESSI; MILADENOVA, 2014; MACEDO, 2014)

Como há escassos relatos, até o momento, na literatura da detecção de PBV2 em amostras de aves, utilizou-se como parâmetros de positividade, estudos em outras espécies. Van Leuween et al. (2010), detectaram por RT-PCR o PBV em 20,5% das amostras de fezes de pacientes, sendo que apenas 1 amostra (1,2%) era positiva para PBV2. Smits et al. (2011), encontraram 6,5% de positividade para o PBV2 nas vias respiratórias de suínos, utilizando a técnica de RT-PCR, porém relataram uma baixa especificidade para esta técnica na detecção deste genogrupo. Chen et al., (2014) evidenciaram a presença de PBV2 em 38,5% das amostras de fezes de suínos na China, utilizando a mesma técnica de Smits et al. (2011). A positividade para PBV2 (11,76%) encontrada neste estudo sugere que a detecção do PBV pode ser diferente entre as espécies animais, dados estes confirmados pela variabilidade nas frequências de positividade observadas na literatura, sendo que estas diferenças podem se dar por motivos variados, como a qualidade das amostras utilizadas; a baixa especificidade dos iniciadores; o tempo decorrido após as colheitas; a temperatura de armazenamento das amostras e o manejo desses animais (CLSI, 2005; SMITH et al., 2015; BELLO, 2010).

SILVA (2012), utilizando as mesmas amostras deste estudo, encontrou o PBV 1 em 19 (51,3%) das 37 granjas e em seis (75%) dos oito municípios estudados. Porém, na presente pesquisa, verificou-se uma menor frequência de PBV2, quando comparada ao PBV1, pois o PBV2 foi encontrado em metade dos municípios e com uma redução de 27,1% das granjas afetadas. Estes resultados estão de acordo com Van Leuween et al. (2010), onde citaram que o PBV2 foi encontrado em menor frequência que o PBV1. Diante do exposto sugere-se que a menor frequência de PBV2 quando comparada ao PBV1 seja em decorrência de falhas no diagnóstico, como inespecificidade dos primers, além de haver poucos estudos para este genogrupo. Com isso há a necessidade de mais pesquisas, a fim de elucidar a menor detecção do PBV2 quando comparado ao PBV1, visto a própria literatura não abordar com maiores detalhes estes achados frequentes.

Estudos que utilizaram a técnica de RT-PCR, relatam que a coinfeção entre cepas de PBV é frequente na literatura. Em suínos, Banyai et al. (2008) verificaram a infecção mista, por diferentes cepas de PBV e Chen et al. (2014) encontraram 23,1% das amostras com coinfeção entre PBV1 e PBV2. Van Leuween et al. (2010) e Ganesh et al. (2011) também relataram a coinfeção entre estes genogrupos, em humanos com diarreia. Malik et al. (2014b) encontraram PBV1 e PBV2 em um bezerro de 7 meses. No presente estudo 3 (30%) amostras, das 10 positivas para PBV2 na RT-PCR, apresentaram os dois genogrupos de PBV (visto que foram testadas as mesmas amostras utilizadas no estudo de Silva, 2012), sugerindo que podem ocorrer infecções mistas concomitantes por PBV em hospedeiros.

Os resultados obtidos na EGPA reforçam os achados de infecções mistas, visto que três (3) amostras apresentaram mais de dois segmentos, sugerindo a presença de dois ou mais agentes nas mesmas, sendo que em três destas amostras, os segmentos apresentaram padrões condizentes com perfil eletroforético de PBV, sugerindo a presença de mais de uma cepa de PBV nessas amostras. Este achado também foi relatado por Ganesh et al. (2011b) em uma criança na Índia e por Masachessi et al. (2012) em amostras de aves, onde os autores relataram uma coinfeção entre cepas de PBV, pelo resultado da EGPA. Portanto a existência de aviários superpovoados, desconfortáveis e estressantes, na avicultura brasileira (INSTITUTO CERTIFIED HUMANE BRASIL, 2017)¹⁰, pode favorecer a transmissão

¹⁰ <http://certifiedhumanebrasil.org/bem-estar-animais-para-frangos-de-corte/>

de diversos agentes, propiciando o aparecimento de várias doenças nesses animais. Outro fator a se considerar, neste trabalho, é a natureza das amostras utilizadas na presente pesquisa, visto que foram colhidas em forma de “pool” de fezes, o que contribui para a detecção de múltiplos agentes na mesma amostra, fato este que pode estar relacionado à presença de infecção mista por cepas de PBV no mesmo plantel.

Nos municípios estudados, houve maior frequência de PBV2 em Santa Bárbara (25%), sendo que este município faz fronteira com o município (Santa Isabel) que concentra a maior quantidade de granjas da região sugerindo-se que, a concentração destas granjas, possa favorecer uma maior disseminação deste agente entre esses animais, além do fato deste município fazer fronteira com os outros três municípios afetados por este vírus, facilitando a circulação deste agente entre estes. Silva (2012) relatou uma maior frequência de PBV1 nos municípios que continham a maior quantidade de granjas da região, atribuindo esta frequência, à distância menor entre estas, favorecendo a disseminação deste agente. Além disso, outros fatores como densidade das granjas e manejo desses animais, etc, podem estar relacionados com a disseminação deste agente nessas áreas, no entanto, estudos epidemiológicos mais aprofundados precisam ser realizados a fim de avaliá-los.

Alguns estudos relatam a infecção por PBV1 em animais de diferentes faixas etárias sugerem que a infecção pode ser adquirida precocemente (GANESH; MASACHESSI; MILADENOVA, 2014). Por outro lado, algumas pesquisas detectaram uma porcentagem baixa deste vírus em crianças, embora não indiquem a preferência de idade na prevalência deste vírus (MARTINEZ et al., 2010). Em aves, há estudos descrevendo que a infecção por PBV1 ocorreu nas primeiras semanas de vida, com maior prevalência na faixa etária de 6 a 7 semanas (TAMEHIRO et al., 2003), 5 a 6 semanas (SILVA et al., 2014) e 3 a 5 semanas (VERMA et al., 2014). No entanto, em um estudo realizado por Masachessi et al. (2012), em perus, não houve uma faixa etária preferencial na detecção do vírus. Em relação ao PBV2, os estudos de Chen et al. (2014), indicaram que animais de diferentes idades podem se infectar, não havendo uma faixa etária preferencial. No presente estudo, houve positividade para PBV2 nas faixas etárias de 3 a 4 e 5 a 6 semanas, com maior frequência em frangos de 5 a 6 semanas de idade e apresentando diferença estatística significativa entre 1 a 2 semanas e 5 a 6 semanas, estando de acordo com os resultados de Silva et al. (2014) e Verma et al. (2014), quando pesquisaram PBV1. A maior frequência de PBV2 nessa faixa etária pode ser explicada pela suscetibilidade dos animais mais jovens a

diversas doenças, nível de imunidade adquirida e diferenças no manejo desses animais, a qual poderia explicar também as diferenças estatísticas entre as semanas. No entanto, por haver poucos estudos relacionados à frequência de PBV2 nas faixas etárias, há a necessidade de mais pesquisas para aprimorar o conhecimento neste assunto.

A EGPA é uma técnica muito útil para o diagnóstico de PBV, apesar da sua sensibilidade limitada, pois caracteriza o perfil de migração desses vírus, além de permitir identificar os PBV circulantes e independe das sequências genômicas deste vírus, contribuindo para o estudo da incidência e da prevalência das infecções causadas por este agente (GANESH; MASACHESSI; MILADENOVA, 2014). As 85 amostras deste estudo foram testadas previamente, por EGPA, no estudo realizado por Silva (2012), revelando a presença do perfil eletroforético longo de PBV nas amostras positivas daquele estudo. Neste trabalho, foram retestadas por EGPA as 10 amostras positivas na RT-PCR, sendo encontradas três amostras com perfil eletroforético longo característico de PBV. Em um estudo realizado por Takiushi et al. (2016) foi relatado a presença dos dois perfis de PBV, em amostras de fezes de bovinos com maior porcentagem para o perfil longo. Battacharya et al. (2007) verificaram a presença do perfil curto de PBV em amostras de humanos, relatando que 62% dessas amostras eram condizentes com este perfil. Em aves, há estudos que utilizaram a EGPA para detecção de PBV, contudo não relataram qual o perfil eletroforético encontrado nas amostras (TAMEHIRO et al., 2003; MASACHESSI et al., 2012). No entanto, na maioria dos estudos relacionados à detecção de PBV por EGPA, o perfil longo é o mais encontrado (PEREIRA et al., 1993; GALLIMORE et al., 1995a; CASCIO et al., 1996; GANESH et al., 2011a; MONDAL et al., 2013; MALIK et al., 2014b; TAKIUSHI et al., 2016; KUNZ, 2017). A presente pesquisa corrobora com estes estudos, visto que das amostras retestadas e que foram positivas na EGPA, encontraram-se somente segmentos com perfil eletroforético longo de PBV. Battacharya et al. (2007) sugeriram que a detecção de PBV de perfil curto, em casos agudos de diarreia aquosa, indicam que o potencial patogênico desse vírus deve ser cuidadosamente examinado, pois este pode pertencer a lista de patógenos que causam diarreia. Por outro lado, outros autores sugeriram que o PBV perfil longo pode estar mais envolvido como patógeno oportunista do que como agente etiológico primário em casos de diarreia (PEREIRA et al., 1993; GIORDANO et al., 2008). Desta forma, infere-se que a ausência de detecção do perfil curto possa estar relacionada

com a pequena ocorrência de distúrbios gastroentéricos observada nos rebanhos desta pesquisa (informação verbal)¹¹. No entanto, estudos adicionais que avaliem a patogenicidade nesses animais são necessários para melhor avaliar esta hipótese.

O sequenciamento genético é amplamente utilizado hoje em dia, na pesquisa de diversos agentes, pois permite fazer a caracterização genética, estudos da variabilidade e a evolução da transmissão interespecie dos agentes estudados (BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GANESH et al., 2011b). Neste estudo, as 10 amostras positivas na RT-PCR para PBV2 foram sequenciadas. Nos testes realizados, se conseguiu êxito na obtenção de sequências satisfatórias para análise sequencial em sete das 10 amostras positivas por RT-PCR, devido a presença de “picos duplos. Carruyo et al. (2008), relataram a obtenção de sequências diferentes a partir de uma mesma amostra, atribuindo tal achado à possibilidade de reconhecimento dos iniciadores a presença de outros agentes. Silva (2012), também encontrou “picos duplos” em sua pesquisa sobre o PBV1, sendo que o mesmo atribuiu este fato possivelmente à presença de mais de um vírus presente nestas amostras. Portanto, a presença de “sequências de baixa qualidade” em pesquisas desta natureza, parece ser um achado comum e pode ser explicado possivelmente pela natureza das amostras utilizadas (amostras colhidas em forma de “pool”). Desta forma, podem estar presentes numerosos agentes, além de que esses animais pertencem a granjas de diversos fornecedores, facilitando a circulação de outros microorganismos entre estes. Uma possibilidade para solucionar este problema seria a realização da clonagem, objetivando-se um maior número de sequências com qualidade, ferramenta que foi utilizada com êxito por Silva (2012).

A similaridade nucleotídica e aminoacídica entre as amostras do presente estudo variou de 92% a 98% e 93% a 98%, respectivamente, indicando uma alta identidade entre as sequências de PBV2. Este achado foi descrito por Smits et al. (2011), em amostras de suínos, relatando uma similaridade de 95% a 98% entre duas amostras de PBV2 clonadas e Ganesh et al. (2011b) em uma criança na Índia, também a partir de uma amostra de PBV2 clonada, encontraram identidade absoluta entre os clones produzidos. Por outro lado, Battacharya et al. (2007) relataram uma alta diversidade genética entre amostras de PBV2, não clonadas, em crianças na Índia. A alta identidade genética entre as amostras deste estudo ficou bem

¹¹ Informação fornecida por René Silva em Belém, em 2018.

demonstrada na árvore filogenética, pois estão agrupadas no mesmo ramo e com apenas 6% e 5% de diversidade nucleotídica e aminoacídica, respectivamente, corroborando com os achados de Smits et al. (2011) e Ganesh et al. (2011b). Diante disto, sugere-se que este agente apresente sequências conservadas em aves e que inclusive, pode se tratar da mesma espécie de PBV2 nesses animais.

Na comparação das sequências deste estudo com outras da literatura verificou-se que as amostras positivas aqui encontradas apresentaram uma alta similaridade nucleotídica (89% a 93%) e aminoacídica (90% a 98%) com a amostra de frango HK-2014, obtida da base de dados (GenBank). Embora o achado desta amostra na Coreia ainda não tenha sido publicado, na análise filogenética verificou-se a formação de um grupo entre a amostra HK-2014 e as amostras da mesorregião metropolitana de Belém, demonstrando uma maior identidade entre esses protótipos do que entre as demais espécies utilizadas na comparação. Alguns estudos com detecção de PBV, relataram que cepas localizadas em regiões geográficas distintas estão mais relacionadas entre si do que entre aquelas localizadas no mesmo surto (BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; GANESH et al., 2011b; MALIK et al., 2014a; CHEN et al., 2014). O estrito grau de relacionamento entre as amostras deste estudo e a coreana pode ser explicado pela presença de ancestrais em comum ou diminuição das barreiras comerciais entre estes países, com o consequente aumento da circulação desses animais, facilitando a transmissão desse agente entre essas espécies de animais.

Ao compararmos amostras de outros animais descritos na literatura e as amostras deste estudo, há uma variação de 39% a 66%, para nucleotídeos e de 24% a 73% para aminoácidos, apresentado uma alta variabilidade genética entre estas espécies de animais. Em um estudo realizado por Verma et al. (2014) em aves, foi relatada uma similaridade genética desses animais com humanos, coelhos, raposas, leões marinhos e suínos, sugerindo que o PBV1 pode ser transmitido de uma espécie para outra. Diversos estudos envolvendo o PBV alertam para a possibilidade de transmissão interespecie entre suínos e humanos (ROSEN et al., 2000; CARRUYO et al., 2008; SYMONDS, GRIFFIN e BREITBART, 2009; GANESH et al., 2010; CHEN et al., 2014). Na presente pesquisa verificaram-se relações genéticas com suínos, humanos, bovinos e primatas não humanos, corroborando com os achados da maioria dos estudos de detecção deste agente, indicando uma alta diversidade genética de PBV2 (BATTACHARYA et al., 2007; VAN LEUWEEN et al., 2010; SMITS et al., 2011;

GANESH et al., 2011b; SILVA, 2012; MALIK et al., 2014b). Uma gama de fatores pode contribuir para a diversidade encontrada, tais como: natureza segmentada do genoma dos PBV, propiciando eventos de “reassortments” entre os segmentos (BATTACHARYA et al., 2007; GANESH et al., 2011b); múltiplas transmissões interespecies de estirpes de PBV (SMITS et al., 2011); tamanho pequeno do fragmento utilizado para análise e à variabilidade do gene estudado (SILVA, 2012). Diante disto, sugere-se uma possível transmissão interespecies de cepas de PBV2, alertando para o possível potencial zoonótico deste agente.

O PBV2 foi relatado em algumas espécies de animais e países como a China, Sri Lanka, Índia e Holanda (BATTACHARYA et al., 2007; VAN LEEUWEN et al., 2010; GANESH et al., 2011b; SMITS et al., 2011; CHEN et al., 2014; MALIK et al., 2015). Em aves, há escassos relatos de PBV2 nesses animais, dificultando a comparação entre estudos, no entanto a alta similaridade entre as amostras deste estudo e o da Coreia, mostram a presença desse vírus em aves nos dois continentes, portanto cuidados na vigilância e no monitoramento desses vírus são necessários, visto que as aves também podem servir de reservatórios para este vírus, com possibilidade inclusive de serem fontes de disseminação do mesmo para outras espécies de animais. Necessita-se, no país e na região, de estudos mais aprofundados que avaliem os aspectos epidemiológicos e moleculares de PBV2, a fim de aprimorar o conhecimento das vias de transmissão, transmissão interespecies, diversidade genética e potencial zoonótico, assim como dos riscos e prejuízos que este agente pode causar na avicultura e na saúde pública, potencializando as ações preventivas e a adoção de medidas que visem impedir a disseminação deste agente entre as espécies de animais.

Este estudo é pioneiro ao registrar o PBV2 em frangos de corte, servindo de base para futuros estudos de PBV, na região bem como no Brasil e no mundo, além da ampliação do conhecimento sobre a circulação e caracterização de PBV2 em aves.

7 CONCLUSÕES

- O PBV 2 foi detectado em frangos de corte da mesorregião metropolitana de Belém nos anos de 2008 a 2012, com maior frequência no município de Santa Barbara do Pará;
- Foi registrada a presença dos dois genogrupos de PBV nas amostras analisadas;
- Este agente só foi detectado em frangos a partir de 3 semanas de vida, sendo que um pequeno número de granjas foi afetado;
- O perfil de genoma visualizado em EGPA foi o longo;
- As amostras deste estudo apresentaram uma alta identidade genética entre si e com uma amostra de aves de um estudo realizado na Coréia;
- As amostras sequenciadas apresentaram maior diversidade genética quando comparadas com outras espécies animais de diferentes regiões geográficas;

REFERÊNCIAS

1. AGENCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO PARÁ (ADEPARÁ). **Pará reforça ações diante de casos de influenza aviária em outros países.** 2017. Disponível em: < <http://www.adepara.pa.gov.br/artigos/par%C3%A1-refor%C3%A7a-a%C3%A7%C3%B5es-diante-de-casos-de-influenza-avi%C3%A1ria-em-outros-pa%C3%ADses>>. Acessado em: 20 jan. 2018.
2. ALBERTS B.; JOHSON A.; LEWIS J.; ROBERTS K.; WALTER P.; RAFF M. **Biologia Molecular da Célula**, 5ª edição. Artmed, 2011.
3. ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.; RESENDE, J.S.; RESENDE, M. **A new bisegmented double stranded RNA virus in avian feces.** Arch. Bras. Medic. Vet. e Zoot., v. 40, p. 437-440, 1988.
4. ALTSCHUL S.F.; GERTZ E.M.; AGARWALA R.; SCHÄFFER A.A.; YU Y.K. **Psi-blast pseudocounts and the minimum description length principle.** Nucleic Acids Res, v. 37 (3), p. 815-824, 2009.
5. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). São Paulo. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo>>. Acessado em: 22 fev. 2018.
6. AVICULTURA INDUSTRIAL. **Sistema de integração na avicultura.** 2016. Disponível em: <<https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/sistema-de-integracao-na-avicultura/20101216-084637-g405>>. Acessado em: 20 jan. 2018.
7. AVISITE. **A Revista do Avisite.** São Paulo. N. 120. 2018. Disponível em:<http://www.revistadoavisite.com.br/web/temp_site/edicaodc49dfebb0b00fd44aef5c60cc1f825.pdf>. Acesso em: 20 Fev. 2018.
8. BÁNYAI K.; JAKAB F.; REUTER G.; BENE, J.; ÚJ M.; MELEGH B.; SZUCS G. **Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak.** Archives of Virology, v.148, p. 2281–2291, 2003.
9. BANYAI K.; MARTELLA V.; BOGDAN A.; FORGACH P.; JAKAB F.; MELEG E.; BIRO H.; MELEGH B.; SZUCS G. **Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains.** Jour. Gener. Virol., v. 89, n. 2, p. 534-539, 2008.
10. BENGIS R.G; LEIGHTON F.A; FISCHER J.R; ARTOIS M; MORNER T. **The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses.** Rev Sci Tech 23: 497– 511. 2004.
11. BELLO C.P. **Molecular Detection and differential Diagnosis of Enteric Viruses from Commercial Chickens.** 60 f. Dissertação (mestrado em ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
12. BERNS K.; PARRISH C. R. **Parvoviridae.** In: **Knipe DM, Howley PM (eds).** Fields Virology, Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; Philadelphia P.2437, 2007.

13. BHATTACHARYA R.; SAHOO G.C.; NAYAK M.K.; SAHA D.R.; SUR D.; NAIK, T.N.; BHATTACHARYA S.K.; KRISHNAN T. **Molecular epidemiology of human picobirnaviruses among children of a slum community in Kolkata, India.** *Infect Genet Evol*, n.6 (6), p.453-458, 2006.
14. BHATTACHARYA R.; SAHOO G.C.; NAYAK M.K.; RAJENDRAN K.; DUTTA P.; MITRA U.; BHATTACHARYA M.K.; NAIK T.N.; BHATTACHARYA S.K.; KRISHNAN T. **Detection of genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhea among children in Kolkata, India.** *Infect Genet Evol.*;7:229–38. 8. 2007.
15. BOOM R.; SOL C.J.; SALIMANS M.M.; JANSEN C.L.; WERTHEIM-VANDILLEN P.M.; VAN DER NOORDA A.J. **Rapid and simple method for purification of nucleic acids.** *J. Clin. Microb.* v. 28, n. 3, p. 495-503,1990.
16. BORGES J.C.; NAZARÉ E.; GOLÇALVES F.; CAPELO R. **Sequenciamento de DNA e suas aplicações.** 2018. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2346804/mod_resource/content/1/Sequenciamento%20de%20DNA%20e%20Aplica%C3%A7%C3%B5es.pdf. Acessado em: 12/11/2018.
17. BUZINARO M.G.; FREITAS P.P.; KISIELLIUS J.J.; UEDA M.; JEREZ J.A.; **Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in calf faeces.** *Jour. Vet.* 166, 185–187. 2003.
18. BROWNING G.F.; CHALMERS R.M.; SNODGRASS D.R.; BATT R.M.; HART C.A.; ORMAROD S.E.; LEADON D.; STONEHAM S.J.; ROSSDALE P.D. **The prevalence of the enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland.** *Equine Veter. Jour.*, v.23, p.405-409, 1991.
19. CARRUYO G.M.; MATEU G.; MARTI´NEZ L.C.; PUJOL F.H.; NATES S.V.; LIPRANDI F.; LUDERT J.E. **Molecular characterization of porcine picobirnaviruses and development of a specific reverse transcription- PCR assay.** *Jour. Clin Microb.* 46:2402–5. 2008.
20. CASCIO A.; BOSCO M.; VIZZI E.; GIAMMANCO A.; FERRARO D.; ARISTA S. **Identification of Picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea.** *Eur. J. Epid.*, 12:545–7. 1996.
21. CHOMEL B.B.; BELOTTO A.; MESLIN F.X. **Wildlife, exotic pets, and emerging zoonoses.** *Emerg Infect Dis* 13: 6–11. 2007.
22. CHEN M.; SUN H.; LAN D.; HUA X.; CUI L.; YUAN C.; YANG Z. **Molecular detection of genogroup I and II picobirnaviruses in pigs in China.** *Vir. Gen.* 48:553-556. 2014.
23. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Collection, Transport, Preparation, and Storage of Specimens for Molecular Methods; Approved Guideline.** CLSI document MM13-A (ISBN 1-56238-591-7). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

24. CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA). Central de comunicação. 2017. Disponível em: <<http://www.cnabrazil.org.br/noticias/brasil-e-o-segundo-maior-produtor-mundial-de-frango>>. Acesso em: 10 Jan. 2018.
25. COSTA A.P.; CUBEL R.C.N.; LABARTHE N.V.; LEITE J.P. G. **Detection of double stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil.** Arq. Bras. Medic. Vet. e Zoot., v. 56, p.554-557, 2004.
26. COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS (ICTV). 2011. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsrna-viruses-2011/w/dsrna_viruses/186/picobirnaviridae>. Acessado em 22 de mar. 2018.
27. CUTLER S.J; FOOKS A.R; VAN DER POEL W.H. **Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world.** Emerg Infect Dis 16: 1–7. 2010.
28. DARNELL J.; LODISH H.; BALTIMORE D. **Molecular Cell Biology. 4th edition. Scientific American Books.** New York: W. H. Freeman; SBN 0-7167-3136-3. 2000.
29. DAY, J.M.; ZSAC, L. **Determination and analysis of the full-length Chicken Parvovirus genome.** Journal Virology. v. 399, n. 1. p. 59 – 64. 2010.
30. DHAMA K.; CHAUHAN R.S.; MAHENDRAN M.; MALIK S.V. **Rotavirus diarrhea in bovines and other domestic animals.** Vet. Res. Commun., v. 33, p. 1-23, 2009.
31. DUQUERROY S.C.B; HENRY C.; VIGOUROUX A.; LIBERSOU S.; LEPAULT J.N.J.; DELMAS B.R.F. **The Picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry.** EMBO J.; 28:1655–65. 2009.
32. EMPRESA BARSILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Concórdia – SC, 2017. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/brasil>>. Acesso em: 29 mar. 2018.
33. FELSENSTEIN J. **Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.** Evolution, v. 39, p. 783-791, 1985.
34. FOLHA WEB. **Agronegócio cresce o dobro da economia.** 2012. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticias/agronegocio_cresce_o_dobro_da_economia>. Acesso em: 09/06/2012.
35. FREGOLENTE M.C.; GATTI M.S. **Nomenclature proposal for Picobirnavirus.** Arch Virol.;154:1953–4. 2009.
36. FREGOLENTE M.C.; MARTINS S.S.; SPILKI F.R.; ALLEGRETTI S.M.; GATTI M.S. **Molecular Characterization of Picobirnaviruses from new Hosts.** Virus Res. Jul;143(1):134-6. 2009.

37. FREITAS D. **Avanços e perspectivas na caracterização do picobirnavírus: inoculação em linhagens celulares, histologia de intestino de ratos e testes de RT-PCR.** Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, pp 76, 2003.
38. GALLAGHER C.A.; NAVARRO R.; CRUZ K.; AUNGB M.I.S.; NG A A.; BAJAKA E.; BEIERSCHMITTA A.; LAWRENCEE M.; DORE K.M.; KETZISA J.; MALIK Y.S.; KOBAYASHIB N.; GHOSHA S. **Detection of picobirnaviruses in vervet monkeys (*Chlorocebus*): Molecular characterization of complete genomic segment-2.** *Vir. Resear.* 230 13–18. 2017.
39. GALLIMORE C.I.; APPLETON H.; LEWIS D.; GREEN J.; BROWN D.W. **Detection and characterisation of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens.** *J Med Virol.*;45:135–40. 1995a.
40. GALLIMORE C.I.; GREEN J.; CASEMORE D.P.; BROWN D.W. **Detection of a Picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans.** *Arch Virol.*;140:1275–8. 1995b.
41. GANESH, B; NATARAJU, S.M; RAJENDRAN, K; RAMAMURTHY, T; KANUNGO, S; MANNA, B; NAGASHIMA, S; SUR, D; KOBAYASHI, N; KRISHNAN, T. **Detection of closely related Picobirnaviruses among diarrhoeic children in Kolkata: Evidence of zoonoses?** *Jou. Mol. Epi. and Evo. Gen. Inf. Dis.*, v. 10, p. 511-516, 2010.
42. GANESH B.; BANYAI K.; MASACHESSI G.; MLADENOVA Z.; NAGASHIMA S.; GHOSH S.; NATARAJU S.M.; PATIVADA M.; KUMAR R.; KOBAYASHI N. **Genogroup I Picobirnavirus in diarrhoeic foals: can the horse serve as a natural reservoir for human infection?** *Vet Res.*;42:52. 2011a.
43. GANESH B.; NAGASHIMA S.; GHOSH S.; NATARAJU S M.; RAJENDRAN K.; MANNA B.; RAMAMURTHY T.; NIYOGI S.K.; KANUNGO S.; SUR D.; KOBAYASHI N.; KRISHNAN T. **Detection and molecular characterization of multiple strains of Picobirnavirus causing mixed infection in a diarrhoeic child: Emergence of prototype Genogroup II-like strain in Kolkata, India.** *Int. J. Mol. Epid. Genet.*, 2 (1): 61-72. 2011b.
44. GANESH B.; BANYAI K.; KANUNGO S.; SUR D.; MALIK Y.S.; KOBAYASHI N. **Detection and molecular characterization of porcine Picobirnavirus in feces of domestic pigs from Kolkata, India.** *Ind J Virol.*; 23:387–91. 2012.
45. GANESH B.; MASACHESSI G.; MLADENOVA Z. **Animal Picobirnavirus.** *VirusDis.* April–June 25(2):223–238. 2014.
46. GATTI M.S; CASTRO A.F.; FERRAZ M.M.; FIALHO A.M.; PEREIRA H.G. **Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces.** *Res Vet Sci.*;47:397–8. 1989.
47. GATTI, M S V. **Picobirnavírus: um novo vírus animal? Características gerais, infecção experimental em ratos e estudos epidemiológicos em suínos.** Tese de doutorado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1994.

48. GHOSH S.; KOBAYASHI N.; NAGASHIMA S.; NAIK T.N. **Molecular characterization of full-length genomic segment 2 of a bovine picobirnavirus (PBV) strain: evidence for high genetic diversity with genogroup I PBVs.** *Jour. Gener Virol.*, v. 90, p. 2519-2524, 2009.
49. GIORDANO, M.O.; MARTINEZ, L.C.; RINALDI, D.; GÚINARD, S.; NARETTO, E.; CASERO, R.; YACCI, M.R.; DEPETRIS, A.R.; MEDEOT, S.I.; NATES, S.V. **Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients.** *AIDS Research and Human Retroviruses*, n. 15, p. 1427–1432, 1999.
50. GIORDANO M.O.; MASACHESSI G.; MARTINEZ L.C.; BARRI P.A.; FERREYRA L.J.; ISA M.B.; NATES S.V. **Two instances of large genome profile picobirnavirus occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977-2002).** *Jour. Infect.*, v. 56, n. 5, p. 371-375, 2008.
51. GIORDANO M.O.; MARTINEZ L.C.; MASACHESSI G.; BARRIL P.A.; FERREYRA L.J.; ISA M.B.; VALLE M.C.; MASSARI P.U.; NATES S.V. **Evidence of closely related Picobirnavirus strains circulating in humans and pigs in Argentina.** *Jour. Infect.* 62:45–51. 2011.
52. GOLDBERG M.B.; STAMM L.M. **Gastrointestinal Tract Infections.** ACO Medicine. Ontario. Canada. 2015. Disponível em: http://www.medicinanet.com.br/conteudos/acp-medicine/6751/infecoes_no_trato_gastrointestinal.htm. Acessado em 13/01/2019.
53. GONZALEZ G.G.; PUJOL F.H.; LIPRANDI F.; DEIBIS L.; LUDERT J.E. **Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela.** *Jour. Med. Virol.*, n.55, p.288–292, 1998.
54. GONZALEZ, G.; SASAKI M.; BURKITT-GRAY L.; KAMIYA T.; TSUJI M.N.; SAWA H.; ITO K. **An optimistic protein assembly from sequence reads salvaged an uncharacterized segment of mouse picobirnavirus.** *Sci. Rep.* 7, 40447; doi: 10.1038/srep40447.2017.
55. GROHMANN G.S.; GLASS R.I.; PEREIRA H.G.; MONROE S.S.; HIGHTOWER A.W.; WEBER R.; BRYAN R.T. **Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group.** *New Engl. Jour. Med.* n 329, p.14–20, 1993.
56. HAGA I.R.; MARTINS S.S.; HOSOMI S.T.; VICENTINI F.; TANAKA H.; GATTI, M.S. **Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (Picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*).** *Jour. Vet.* 158, 234–236. 1999.
57. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>> Acessado em 20 jan. 2018.
58. INSTITUTO CERTIFIED HUMANE BRASIL. **Veja oito aspectos de bem-estar animal para frangos de corte.** Brasil. 2017. Disponível em: <<http://certifiedhumanebrasil.org/bem-estar-animal-para-frangos-de-corte/>>. Acessado em: 29 fev.208

59. KANG J.S.; CHOI K.S.; SHIN S.H.; MOON I.S.; LEE S.G.; LEE S.H. **Development of an efficient PCR-based diagnostic protocol for the identification of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda, Parasitaphelenchidae).** *Nematology* 6, 279-285. 2004.
60. KASPER D.L.; FAUCI A.S.; HAUSER S.L.; LONGO D.L.; JAMESON J.L.; LOSCALZO J. **HARRISON'S - Principles of Journal Medicine**, 19^o Edição. 2016. Disponível em: <accessmedicine.com>. Acessado em: 20 mai. 2017.
61. KATOH K.; STANDLEY D.M. **MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability.** *Mol. Bio. Evol.* 30(4): 772-780. 16 jan. 2013.
62. KEARSE M.; MOIR R.; WILSON .; STONES-HAVAS S.; CHEUNG M.; STURROCK S.; BUXTON S.; COOPER A.; MARKOWITS S.; DURAN C.; THIERER T.; ASHTON B.; MEINTJES P.; DRUMMOND A. **Geneious basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data.** *Bioinformatics.* Vol. 28. N. 12. pp 1647-1649. 2012.
63. KOCI M.D.; SEAL B.S.; SCHULTZ-CHERRY S. **Detection of Turkey Astrovirus by RT-PCR.** *Jour. Virol. Methods*, v. 90, n. 1, p. 79-83, 2000.
64. KUNZ A.F. Universidade Federal do Paraná. **Detecção e Caracterização Molecular de Picobirnavirus em Hospedeiros Ovinos.** 76f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal. 2017.
65. LARSSON A. **Aliview: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets.** *Bioinformatics.* Vol. 30. N. 22. pp 3276-3278. 5 ago. 2014.
66. LEITE J.P.G; MONTEIRO S.P.; FIALHO A.M.; PEREIRA H.G. **A novel avian virus with trisegmented double-stranded RNA and further observations on previously described similar viruses with bisegmented genome.** *Virus Res*, n.16 (2), p.119–126, 1990.
67. LUDERT JE, LIPRANDI F. **Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis.** *Res Virol.*;144:219–24. 1993.
68. LUDERT J.E.; ABDUL-LATIFF L.; LIPRANDI A.; LIPRANDI F. **Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double stranded RNA, in rabbit faeces.** *Res. Vet. Sci.* 59, 222–225. 1995.
69. MACEDO, R. Universidade Federal do Paraná: **Detecção e Caracterização de Picobirnavírus em Fezes de Bezerro Naturalmente Infectados.** 2061f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Paraná, Palotina. 2014.
70. MACKENZIE J.S; JEGGO M. **Reservoirs and vectors of emerging viruses.** *Curr Opin Virol.* 2013.
71. MALIK Y.S.; CHANDRASHEKAR K.M.; SHARMA K.; HAQ A.A.; VAID N.; CHAKRAVARTI S.; BATRA M.; SINGH R.; PANDEY A.B. **Picobirnavirus detection**

in bovine and buffalo calves from foothills of Himalaya and Central India. *Trop. Anim. Health Prod.* 43, 1475–1478. 2011.

72. MALIK Y.S.; KUMAR N.; SHARMA K.; DHAMA K.; SHABBIR M.Z.; GANESH B.; KOBAYASHI N.; BANYAI K. **Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains.** *BioMed. Res. Int.* 14, 1–13. 2014a.

73. MALIK Y.S.; SHARMA A.K.; KUMAR N.; SHARMA K.; GANESH B.; KOBAYASHI N. **Identification and characterisation of a novel genogroup II picobirnavirus in a calf in India.** *Veter. Record.* 174: 278 originally published online February 25, 2014b.

74. MALIK Y.S.; SHARMA H.K.; KUMAR N.; SHARMA K., GANESH B., KOBAYASHI N. **Identification and characterizations of a novel genogroup II picobirnavirus in a calf in Índia.** *Vet. Rec.* Jun. 10, 2015.

75. MARTÍNEZ L.C.; GIORDANO M.O.; ISA M.B.; ALVARADO L.F.; PAVÁN J.V.; RINALDI D.; NATES S.V. **Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobirnavirus.** *Intervirology*, v. 46, p. 207-213, 2003.

76. MARTÍNEZ L.C.; MASACHESSI G.; CARRUYO G.; FERREYRA L.J.; BARRIL P.A.; ISA M.B.; GIORDANO M.O.; LUDERT J.E.; NATES S.V. **Picobirnavirus causes persistent infection in pigs.** *Infect Genet Evol.*;10:984–8. 2010.

77. MASACHESSI G.; MARTINEZ L.C.; GIORDANO M.O.; BARRIL P.A.; ISA B.M.; FERREYRA L.; VILLAREAL D.; CARELLO M.; ASIS C.; NATES S.V. **Animal Picobirnavirus 237 Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals.** *Arch Virol.*152:989–98. 2007.

78. MASACHESSI G.; MARTINEZ L.C.; GANESH B.; GIORDANO M.O.; BARRIL P.A.; ISA M.B.; IBARS A.; PAVAN J.V.; NATES S.;. **Establishment and Maintenance of persistent infection by Picobirnavirus in greater rhea (*Rhea americana*).** *Arch Virol.*;157:2075–82. 2012.

79. MONDAL A.; CHAKRAVARTI S.; SHARMILA B.; MAJEE & BANNALIKAR A.S. **Detection of picobirnavirus and rotavirus in diarrhoeic faecal samples of cattle and buffalo calves in Mumbai metropolis, Western India.** *Vet. Ital.* 49 (4), 357-360. doi: 10.12834/VetIt.1109.10. 2013.

80. MONTEIRO S.P.; FIALHO A.M.; PEREIRA H.G.; LEITE J.P.G. **Viruses with segmented double-stranded RNA in chickens.** *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.* 42:141–6. 1991.

81. NATES S.V.; GATTI M.S.; LUDERT J.E. **The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential.** *Future Virology*; n 6(2): p. 223-235, 2011.

82. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). EUA. **National Library of Medicine.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/?term=picobirnavirus>>. Acessado em: 29 mar. 2018.

83. NG T.F.F.; MESQUITA J.R.; NASCIMENTO M.S.J.; KONDOV N.O; WONG W.; REUTER G.; KNOWLESF N.J.; VEGAG E.; ESONAH M.D.; DENG X.; VINJÉG J.; DELWART E. **Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses.** *Vet Microb.* Jun 25; 171(0): 102–111. doi:10.1016/j.vetmic.2014.04.005. 2014.
84. NGUYEN L.T.; SCHMIDT H.A.; VON HAESLER A.; MINH B.Q. **IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies.** *Mol Biol Evol*, v. 32 (1), p. 268-274, 2014.
85. PANG X.L.; LEE B.; BOROUMAND N.; LEBLANC B.; PREIKSAITIS J.K.; CHARLOTTE C; YU I.P. **Increased Detection of Rotavirus Using a Real Time Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Assay in Stool Specimens From Children With Diarrhea.** *Jour. Med. Virol.* 72:496–501. 2004.
86. PANTIN-JACKWOOD M.J.; DAY J.M.; JACKWOOD M.W.; SPACKMAN E. **Enteric Viruses detected by Molecular Methods in Commercial Chicken and Turkey Flocks in the United States between 2005 and 2006.** *Avi. Disea.* v. 52, p. 235-244. 2008.
87. PEREIRA H.G.; AZEVEDO R.S.; LEITE J.P.; BARTH O.M.; SUTMOLLER F.; FARIAS V.; VIDAL M.N. **Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), immuno-electron microscopy (IME) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children.** *Mem. Inst. Osw. Cruz*, v. 78 (4), p. 483-490, 1983.
88. PEREIRA H.G; FIALHO A.M; FLEWETT T.H; TEIXEIRA J.M; ANDRADE Z.P. **Novel viruses in human faeces.** *Lancet.*, 2:103–4. 1988a.
89. PEREIRA H.G, FLEWETT T.H, CANDEIAS J.A, BARTH O.M. **A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines.** *J Gen Virol.*;69:2749–54. 1988b.
90. PINTO L.S.; KREMER F.S. Plataforma de sequenciamento de nova geração e pré-processamento de dados. 2016. Disponível em: http://labbioinfo.ufpel.edu.br/aulas_2016/Capitulo%203.docx. Acessado em: 12/11/2018.
91. ROSEN B.I; FANG Z.Y; GLASS R.I; MONROE S.S. **Cloning of human Picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay.** *Virology.*;277:316–29. 2000.
92. SAIF, Y. M. **Viral Enteric Infections IN: Diseases of Poultry.** 11 th. Ed. Ames, IA: Iowa State University Press, p. 299-300. 2003.
93. SAIF Y.M; FADLY A.M, GLISSON J.R, MCDUGALD L.R, NOLAN L.K, AND SWAYNE D.E. **Viral enteric infections,” in *Diseases of Poultry* Eds.** Blackwell, Ames, Iowa, USA. pp. 329–330, 2008.
94. SANGER F.; NICKLEN S.; COULSON A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemistry.* Vol. 74. N. 12. pp 5463-5467. Dec. 1977.

95. SILVA R.R. **Detecção, epidemiologia e análise molecular de rotavírus, picobirnavírus e reovírus em aves de corte criadas em granjas na mesorregião metropolitana de Belém, Pará.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.
96. SILVA R.R.; BEZERRA D.A.; KAIANO J.H.; OLIVEIRA D.S.; SILVESTRE R.V.; GABBAY Y.B.; GANESH B.; MASCARENHAS J.D. **Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study.** J. Gen. Virol. 95, 117–122. 2014.
97. SMITS S.L.; POON L.L.M.; VAN LEEUWEN M.; LAU P.; PERERA H.K.K.; MALIK J.S.P.; SIMON J.H.; OSTERHAUS A.D.M.E. **Genogroup I and II Picobirnaviruses in Respiratory Tracts of Pigs.** Emerging Infectious Diseases. Emerg. Infec. Diseases. Vol. 17, No. 12 dez. 2011.
98. SMITS S.L.; VAN LEEUWEN M.; SCHAPENDONK C.M.E.; SCHÜRCH A.C.; BODEWES R.; HAAGMANS B.L.; OSTERHAUS A.D.M.E. **Picobirnaviruses in the Human Respiratory Tract.** Emerg. Inf. Dis. Vol. 18, N. 9 set. 2012.
99. SNUSTAD P.; SIMONS M.J. **Fundamentos de Genética**, 4ª edição. Guanabara Koogan, 2008.
100. SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS (SIB). **VIRALZONE: A knowledge Recource to Understand Virus Diversity.** 2017. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/602?outline=all_by_species>. Acessado em 20 jan. 2018.
101. SYMONDS, E.M.; GRIFFIN, D.W.; BREITBART, M. **Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States.** App. Environment. Microb., v. 75, p. 1402-1409, 2009.
102. TAMEHIRO C.Y.; ALFIERI A.F.; MEDICI K.C.; ALFIERI A.A. **Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken.** Bras J Microb. 34:349–53. 2003.
103. TAMURA K., STECHER G.; PETERSON D.; FILIPISKI A.; KUMAR S. **MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0.** Mol. Biol. Evol. 30(12). pp. 2725-2729. 2013.
104. TAKIUCHI E.; MACEDO R.; KUNZ A.F.; GALLEGOS J.C.; MELLO J.L.; OTONEL R.A.A.; ALFIERI A.A. **Electrophoretic RNA genomic profiles of Brazilian Picobirnavirus (PBV) strains and molecular characterization of a PBV isolated from diarrheic calf.** Vir. Res. 211 58–63. 2016.
105. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, p. 619-621. Atheneu (Ed.), 5ª Edição, São Paulo. 2008.
106. UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEFF). **A Saga da Avicultura Brasileira. Rio de Janeiro.** 2011. 120p. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/fcc1856de5f036bb47a8a246a0781e26.pdf>> Acessado em: 22 mai. 2017.

107. VAN LEEUWEN M.; WILLIAMS M.M.; KORAKA P.; SIMON J.H.; SMITS S.L.; OSTERHAUS A.D. **Human picobirnaviruses identified by molecular screening of diarrhea samples.** *Jour. Clin. Microb.*, n.48, p.1787-94, 2010.
108. VERMA, H.; MOR S.K.; ERBER J.; GOYAL S.M. **Prevalence and complete genome characterization of turkey picobirnaviruses.** *Infect. Genet. Evol.* 2014.
109. WAKUDA M.; PONGSUWANNA Y.; TANIGUCHI K. **Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human Picobirnavirus.** *J Virol Methods.*;126:165–9. 2005.
110. WANG Y.; BÁNYAI K.; TU X.; JIANG B. **Simian genogroup I picobirnaviruses:prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential.** *J. Clin. Microbiol.* 50,2779–2782. 2012.
111. WILBURN L.; YODMEEKLIN A.; KOCHJAN P.; SAIKRUANG W.; KUMTHIP K.; KHAMRIN P.; MANEEKARN N. **Molecular detection and characterization of picobirnaviruses in piglets with diarrhea in Thailand.** *Arch Virol* DOI 10.1007/s00705-016-3190-3. 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE 1 – Preparo do reagente Tris-HCl/CaCl₂, pH 7,2 utilizado no preparo da suspensão.

- a) No reservatório de pesagem, pesar em uma balança analítica 0,22g de Cloreto de Cálcio e 1,21g de Tris Base, em seguida, depositar os conteúdos pesados no Becker;
- b) Adicionar tais reagentes a 200mL de água milli-Q;
- c) Homogeneizar utilizando o agitador magnético até total dissolução;
- d) Homogeneizar e completar com água milli-Q até o volume de 1000mL;
- e) Utilizar o medidor de pH para ajustar o pH 7,2 com ácido clorídrico 37% realizado em capela de exaustão;
- f) Transferir o conteúdo para o frasco de vidro transparente com tampa de rosca devidamente rotulada com a descrição da solução/reagente, lote, validade e nome do responsável pelo preparo.
- g) Autoclavar a solução de acordo com as condições de autoclavagem de 121°C por 10 minutos.

APÊNDICE 2 – Preparo dos reagentes utilizados para extração do material genético.

a) Sílica:

REAGENTES	QUANTIDADES
Sílica	60 g
Água destilada qsp	500 mL

Homogeneizar a sílica e deixar sedimentar por 24h. Aspirar por sucção 430 ml, desprezar o sobrenadante. Completar o volume para 500ml com água destilada, homogeneizar, sedimentando-se naturalmente por 5 h. Aspirar, por sucção, 440 ml do sobrenadante e desprezá-lo. Ajustar o sedimento para pH 2,0 pela adição de 600 µl de ácido clorídrico 37%. Aliquotar 10 ml da solução em frascos de cor âmbar, autoclavar e estocar à temperatura ambiente (TA).

b) Tampão L2:

REAGENTES	QUANTIDADES
Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris HCl 0,1M, pH 6,4	100 mL

Homogeneizar o isotiocianato de guanidina juntamente com o Tris-HCl 0,1M, pH 6,4, até dissolver totalmente o soluto. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

c) Tampão L6:

REAGENTES	QUANTIDADES
Isotiocianato de guanidina	120 g
Tris HCl 0,1M, pH 6,4	100 mL
Triton X-100	1,3 g
EDTA 0,2M, pH 8,0	22 mL

Em um recipiente de vidro colocar EDTA 0,2M, pH 8,0, juntamente com Tris HCl 0,1M, pH 6,4. Adicionar o isotiocianato de guanidina e homogeneizar até total dissolução. Por último, acrescentar Triton X-100 lentamente. Armazenar em frascos de cor âmbar e estocar a TA.

APÊNDICE 3 - Preparo dos reagentes utilizados para realização da EGPA.

a) Reagentes para o preparo do gel de poliacrilamida para cuba pequena:

REAGENTES	QUANTIDADES
Água destilada	6280 μ L
Acrilamida/Bis-acrilamida	1660 μ L
Tris base	1870 μ L
TEMED	6 μ L
Persulfato de amônio 10%	133 μ L

b) Reagentes para o preparo do tampão de eletroforese

REAGENTES	QUANTIDADES
Tampão tris glicina 10X	10 mL
Água destilada qsp.	100 mL

c) Fixador

REAGENTES	QUANTIDADES
Etanol PA	10 mL
Ácido Acético PA	0,5 mL
Água destilada qsp	100 mL

d) Corante

REGAENTES	QUANTIDADES
Nitrato de Prata	1 mL
Água destilada qsp	100 mL

e) Revelador

REAGENTES	QUANTIDADES
Hidróxido de Sódio 10M	7,5 mL
Formaldeído PA	0,8 mL
Água destilada qsp	100

APÊNDICE 4 - Preparo dos reagentes utilizados na reação de RT-PCR

a) MIX RT

b) Adicionou-se 12,25 μL de H_2O livre de RNase e DNase + 5 μL de tampão (5x, Promega®) + 1 μL de dNTPs (Promega®) + 1,5 de MgCl_2 (25 mM, Promega®) e 0,25 μL de RT (20 U, Promega®).

c) MIX PCR

Adiciona-se 15,25 μL de H_2O livre de RNase e DNase + 3 μL de dNTPs (Promega®) + 5 μL de tampão 5x (Promega®) + 1,5 μL de MgCl_2 (25mM Promega®) + 0,25 μL de Taq DNA polimerase (1,25 U, Promega®).

ANEXO

ANEXO 1 – Autorização para utilização das amostras armazenadas no Instituto Evandro Chagas - LABVIR



SIPAR: 25209.004918/2017-79

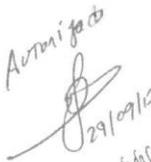
Carta de nº 01/2017/SAVIR/IEC/SVS/MS
Dr. Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Diretor do Instituto Evandro Chagas

Ananindeua/PA, 28 de setembro de 2017.

Solicitamos de V. Sa. autorização para o processamento dos espécimes de amostras fecais de aves pertencente ao acervo da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas, as quais foram colhidos quando da realização do projeto intitulado “Detecção de Rotavírus, Picobirnavírus e Reovírus em aves de corte criadas em granjas na mesorregião metropolitana de Belém – Pará - Brasil, ocorrido no período de outubro/2008 a maio/2011. Gostaríamos de utilizar as referidas amostras em um novo estudo intitulado “Detecção de Picobirnavírus genogrupo II em aves de corte, na Mesorregião Metropolitana de Belém – Pará – Brasil”.


Joana D'Arc Pereira Mascarenhas
Coordenadora do Projeto

Autorizamos o processamento dos espécimes conforme solicitado.


29/09/17
Pedro Fernando da Costa Vasconcelos
Diretor do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS
Port. nº 258, de 28/02/2016


Dr. Alexandre Linhares
Chefe da Seção de Virologia
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS