



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS
MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS

**OCORRÊNCIA DE ROTAVÍRUS DO GRUPO D EM AVES CRIADAS EM
GRANJAS NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE
BELÉM, PARÁ**

DELANA ANDREZA MELO BEZERRA

Belém – Pará

2012

DELANA ANDREZA MELO BEZERRA

**OCORRÊNCIA DE ROTAVÍRUS DO GRUPO D EM AVES CRIADAS EM GRANJAS
NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM, PARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

Belém – Pará

2012

**Dados Internacionais de Catalogação-na- Publicação (CIP) –
Biblioteca do Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, Belém-PA**

Bezerra, Delana Andreza Melo.

Ocorrência de rotavírus do grupo D em aves criadas em granjas na mesorregião metropolitana de Belém, Pará / Delana Andreza Melo Bezerra; orientadora, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas. – 2012

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Núcleo de Medicina Tropical. Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Belém, 2012.

1. Rotavírus. 2. Aves. 3. Belém - Pará. I. Mascarenhas, Joana D'Arc Pereira, orient. II. Título.

CDD: 22. ed. 616.34098115

DELANA ANDREZA MELO BEZERRA

**OCORRÊNCIA DE ROTAVÍRUS DO GRUPO D EM AVES CRIADAS EM GRANJAS
NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM, PARÁ.**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovada em: 29 /02/2012

Conceito: Excelente

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Joana D’Arc Pereira Mascarenhas.
Orientadora – Instituto Evandro Chagas

Prof^a. Dr^a. Ana Cecilia Ribeiro Cruz.
Membro – Instituto Evandro Chagas

Prof. Dr. Rodrigo Vellasco Duarte Silvestre
Membro – Instituto Evandro Chagas

Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Guimarães De Moraes
Membro – Universidade Federal do Pará

A minha mãezinha (in memoriam), que um dia desejou que seus filhos se tornassem Doutores e esse desejo, ainda que no início da jornada, está no rumo da concretização. Ao meu eterno amor e futuro esposo Fernando Coelho por existir em minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua presença constante em minha vida.

A minha família, em especial a minha tia Mariana, que se tornou uma segunda mãe. Ao meu querido irmão Orvacio pelo amor incondicional. Ao meu sobrinho Lucas pelo carinho.

A minha orientadora, Dra Joana D'Arc Pereira Macarenhas, minha imensa gratidão pela oportunidade dada e os conhecimentos repassados.

Ao idealizador do projeto ROTAVÍRUS EM AVES Dr. René Ribeiro da Silva, pela amizade e companheirismo em todos os momentos.

Aos Drs. Jane Kaiano, Darleise Oliveira, Fernanda Ságica, Rodrigo Vellasco pela imensa colaboração ofertada.

Ao Instituto Evandro Chagas, Núcleo de Medicina Tropical e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico por todo apoio técnico científico ofertado.

A todos amigos da Seção de Virologia, em especial ao Laboratório de Rotavírus.

"O começo da sabedoria é encontrado na dúvida; duvidando começamos a questionar, e procurando podemos achar a verdade."

(Pierre Abelard)

RESUMO

Os rotavírus infectam seres humanos e várias espécies de animais e são constituídos por partículas icosaédricas, não envelopadas, formadas por um genoma de 11 segmentos de dsRNA. São classificados em sete grupos designados de A-G. O rotavírus do grupo D (RVs-D) tem sido documentado em aves, porém existem poucos estudos disponíveis, principalmente com dados de detecção por RT-PCR e obtenção de sequências nucleotídicas. Este estudo objetivou investigar a ocorrência de RVs-D em aves criadas em granjas situadas na Mesorregião Metropolitana de Belém- Pará, no período compreendido entre 2008 a 2011. Foram colhidos 85 pools de amostras fecais provenientes de 37 granjas pertencentes a oito municípios da Mesorregião Metropolitana de Belém. O dsRNA viral foi extraído a partir das suspensões fecais e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) seguido da RT-PCR realizada a partir da construção de iniciadores específicos para os genes VP6 e VP7 do RVs-D. Foi selecionada uma amostra positiva de cada município para o sequenciamento de nucleotídeos dos genes VP6 e VP7, sendo cinco amostras clonadas. A EGPA demonstrou positividade em 14/85 (16,5%) amostras e a RT-PCR em 30/85 (35,3%) amostras. Dos oito municípios estudados, sete apresentaram amostras positivas para RVs-D. Dentre as 37 granjas pertencentes a esses municípios foi observado a presença dessa infecção viral em 17 (45,9%) das granjas estudadas. O intervalo de idade em que o RVs-D foi detectado com maior frequência foi o de aves entre 16 a 30 dias (23/37 – 62%) do total de amostras nesta faixa etária. As sequências nucleotídicas das sete amostras foram classificadas como pertencentes ao RVs-D com *bootstrap* de 100 corroborando com esse agrupamento. As sequências do gene VP6 apresentaram 90,8-91,3% de similaridade com o protótipo de RVs-D (05V0049) e 98,5-99,9% de similaridade quando comparadas entre si. Para o gene VP7 apresentaram 87-96,1% de similaridade com o protótipo deste grupo e foram 94,1-100% similares quando comparados entre si. A presente análise assume um caráter pioneiro no Brasil e no mundo, permitindo ampliar os conhecimentos acerca do RVs-D.

Palavras chaves: Rotavírus do grupo D; Aves; Granjas; RT-PCR.

ABSTRACT

Rotaviruses infect human beings and various species of animals. They are composed of non-enveloped icosahedral particles formed by a genome of 11 segments of dsRNA. They are classified into seven groups designated from A-G. The rotaviruses of group D (RVs-D) have been documented in birds; however there are few studies available especially the RT-PCR detection data with obtainment of nucleotide sequence. The aim of this study is to investigate the occurrence of RVs-D among the birds raised in farms situated in the metropolitan mesoregion of Belem, Para-Brazil during the period between 2008 and 2011. 85 pools of faecal samples were collected from 37 farms in eight counties of the metropolitan mesoregion of Belem. The viral dsRNA were extracted from faecal suspensions and submitted to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) followed by RT-PCR conducted using the specific primers for VP6 and VP7 genes of the RVs-D, one positive sample was collected from each county for nucleotide sequencing of VP6 and VP7 genes, with five samples being cloned. The PAGE showed positivity in 14/85 (16.5%) of the samples and the RT-PCR in 30/85(35%) of the samples. Among the eight counties studied, seven presented samples positive for RVs-D and the viral infection was observed in 17(45.9%) of the 37 farms in these counties. The age interval where the RVs-D was detected at higher rate was among birds aged between 16 and 30 days (23/37-62%) of the total at this age. the nucleotide sequences of the seven samples were classified as RVs-D with bootstrap of 100 corroborating with this grouping. the sequences of VP6 gene presented 90.8-91.3% of similarity with the prototypes of RVs-D (05V0049) and when compared among themselves. The VP7 genes presented 87-96.1% similarity with the prototype of this group (94.1-100% similarity) when compared among themselves. This analysis is a pioneer of its kind in Brazil and in the world, and it seeks to expand the knowledge about RVs-D.

Key words: Rotavirus Group D, Birds, Farms, RT-PCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Micrografia Eletrônica do Rotavírus	16
Figura 2	Partícula de rotavírus completa e infectiva, com base em reconstituições cryoEM e atribuições de densidades.	20
Figura 3	Interações de VP2 e VP6	20
Figura 4	Proteína VP6	21
Figura 5	Proteína VP7	21
Figura 6	Representação esquemática da estrutura dos genes dos Rotavírus.	23
Figura 7	Representação esquemática dos segmentos genômicos e estrutura tridimensional da partícula de rotavírus de SA11.	23
Figura 8	Demonstração esquemática do padrão de migração eletroforética dos segmentos das amostras de rotavírus dos grupos A a G.	24
Figura 9	Padrão de migração de Rotavírus em aves dos grupos A e D.	25
Figura 10	Propriedades estruturais e antigênicas da VP6	26
Figura 11	Propriedades estruturais e antigênicas da VP7	27
Figura 12	Municípios em que foram realizadas as colheitas das amostras	32
Figura 13	Representação esquemática da colheita	33
Figura 14	Lote aviário em que foi realizado uma das colheitas	36

Figura 15	Representação esquemática do preparo das suspensões fecais	34
Figura 16	Representação esquemática da extração do genoma viral	35
Figura 17	Representação esquemática da Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	36
Figura 18	Primer RD6F e RD6R	38
Figura 19	Primer RD9F e RD9R	38
Figura 20	Organograma da RT-PCR.	39
Figura 21	Perfil eletroforético dos RVs-D demonstrados por eletroforese em gel de poliacrilamida	43
Figura 22	Amplificação dos genes VP6 e VP7 dos RVs-D	44
Figura 23	Positividade de RVs-D nas granjas estudadas.	45
Figura 24	Positividade encontrada para RVs-D por município utilizando as técnicas de EGPA e RT-PCR.	46
Figura 25	Curva ROC demonstrando sensibilidade e especificidade para os métodos de EGPA e RT-PCR.	47
Figura 26	Dendograma baseado na sequencia parcial de nucleotídeo do gene VP6 do RVs-D	48
Figura 27	Dendograma baseado na sequencia parcial de nucleotídeo do gene VP7 do RVs-D	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADEPARA- Defesa Agropecuária do Estado Pará
aa – aminoácido
°C – Graus centígrados
µL – Microlitro
cDNA - DNA complementar
crio-ME – criomicroscopia eletrônica
DLP - partículas de dupla camada
dsRNA - ácido ribonucléico de dupla cadeia
EGPA - eletroforese em gel de poliacrilamida
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEC – Instituto Evandro Chagas
IFN - interferon
mA - milli-Âmperes
mg – miligrama
mL - mililitro
ng – nanogramas
MA-104- Linhagem contínua de rim de macaco rhesus
nm – nanômetros
NSP – Proteína não estrutural
ORF - fase aberta de leitura
pb – Pares de bases
RA - regiões antigênicas
RE - retículo endoplasmático
RNA (-) – RNA de polaridade negativa
RNAm - RNA mensageiro
RPM - rotações por minuto
RT-PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida de transcrição Reversa
RV – Rotavírus
SG - Subgrupo
TA - temperatura ambiente
TBE - tampão tris-borato-EDTA
V – volts
VORH - Vacina Oral de Rotavírus Humano
VP – Proteína estrutural
VR - regiões variáveis
W – Watts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. JUSTIFICATIVA	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1. ROTAVÍRUS.....	16
3.2. CLASSIFICAÇÃO EM GRUPOS	18
3.3. ESTRUTURA VIRAL	19
3.4. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA	22
3.5. PERFIL ELETROFORÉTICO	23
3.6. PROTEÍNA VP6	25
3.7. PROTEÍNA VP7	26
3.8. REPLICAÇÃO VIRAL	27
4. OBJETIVOS	31
4.1. GERAL	31
4.2. ESPECÍFICOS	31
5. MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1. ÁREA DE ESTUDO	32
5.2. COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	33
5.3. SUSPENSÕES FECALIS	34
5.4. EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL.....	35
5.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA).....	36
5.6. BIOLOGIA MOLECULAR	37
5.6.1. Construção dos iniciadores.....	37
5.6.2. Reação em Cadeia mediada pela Polimerase e precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR).....	38
5.6.3. Eletroforese em Gel de Agarose.....	39
5.6.4. Clonagem e Sequenciamento	40
5.6.5. Análise das sequências	40
5.6.6. Análise estatística	41
6. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	42
7. RESULTADOS	43
7.1. DETECÇÃO DO RVS-D POR EGPA	43
7.2. DETECÇÃO DO RVS-D POR RT-PCR.....	44
7.3. POSITIVIDADE POR MUNICÍPIOS E GRANJAS.....	45
7.4. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EGPA E RT-PCR.....	46

7.5. FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO A IDADE.....	47
7.5. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	48
7.5.1 VP6.....	48
7.5.2 VP7.....	49
8. DISCUSSÃO	51
9. CONCLUSÕES.....	55
10. PERSPECTIVAS	56
11. REFÊRENCIAS	57
12. ANEXO/ APÊNDICE.....	65

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas que afetam o trato gastrointestinal em aves apresentam uma distribuição mundial e uma etiologia complexa (REYNOLDS et al., 1987; YEGANI e KORVE, 2008; LOJKIĆ et al., 2009; FIORETTI et al., 2011; KAWAI et al., 2011; HARVALA et al., 2012; VELAZQUEZ et al., 2012). Dentre os agentes de etiologia viral os Rotavírus (RVs) se constituem em um dos mais frequentes agentes isolados a partir de aves e já foram detectados em patos, faisões, frangos, pombos, perus e aves silvestres (MCNULTY et al., 1978; TAKASE et al., 1986; GOUGH et al., 1992; LEGROTTAGLIE et al., 1997; ELSCHNER et al., 2005; URSU et al., 2011; OTTO et al., 2011).

A infecção por rotavírus pode ser assintomática ou sintomática, (TAMEHIRO et al., 2003; VILLARREAL, 2006; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007). Na presença de sinais clínicos de doenças esses podem estar relacionados com a gastroenterite e a síndrome nanismo com redução na taxa de conversão alimentar e no ganho de peso, depressão da taxa de crescimento, perda de uniformidade do rebanho, podendo ocasionar prejuízos econômicos para a indústria de frangos de corte (PAGE et al., 1982; OTTO et al., 2006; REBEL et al. 2006; ANONYMOUS et al., 2008; SPACKMAN et al., 2010;).

Os grupos A, D, F e G de RVs já foram detectados em aves sendo que os integrantes do grupo A são os RVs mais amplamente dispersos e conhecidos e têm sido associados a gastroenterite no homem (MASCARENHAS et al., 1996; ARAUJO et al., 2001; MASCARENHAS et al., 2006; FLAHAULT e HANSLIK., 2010; KAWAI et al., 2011; TAYEB et al., 2011) e animais (RÁCZ et al., 2000; GABBAY, et al., 2003; FUKAI et al., 2006; REIDY et al., 2006; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007; SCHUMAN et al., 2009; JINDAL et al., 2010; SILVA et al., 2011; URSU et al., 2011).

Os Rotavírus do grupo D (RVs-D) apesar de terem sido frequentemente encontrados em aves, basicamente por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (EGPA) (OTTO et al., 2006; KARIN et al., 2007; SAVITA et al., 2008; ISLAN et al., 2009), poucos estudos relativos á detecção utilizando métodos mais sensíveis como a Reação em Cadeia mediada pela Polimerase e precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR) (OTTO et al., 2011) e obtenção de sequencias nucleotídicas estão disponíveis. Por esta razão, é importante a detecção e caracterização desses

agentes visando proporcionar a ampliação do conhecimento de sua frequência, epidemiologia e sequência genômica.

2. JUSTIFICATIVA

Os RVs-D são patógenos comuns em aves e são muitas vezes associados a doenças nesses animais (VILLARREAL, 2006; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007, OTTO et al., 2011), podendo levar a prejuízos econômicos, principalmente para aves que são comercializadas em grande escala, como os frangos de corte. Apesar de serem relativamente comuns em aves, poucos estudos tem abordado especificamente o grupo D. Segundo nosso conhecimento, até o presente momento apenas um estudo descreveu a sequência nucleotídica de uma amostra viral de RVs-D (TROJNAR et al., 2010). No Brasil, os dados são ainda mais escassos, pois não há investigações da ocorrência de RVs-D em aves e os poucos estudos descritos não classificaram em grupos os RVs encontrados (TAMEHIRO et al., 2003).

O presente estudo é um dos pioneiros nesse âmbito tanto no Brasil quanto no mundo, visando à detecção desse agente por métodos mais sensíveis do que os usados anteriormente e obtendo mais informações sobre o genoma dos RVs-D. Dessa forma será possível identificar fatores de entraves para o setor avícola, isolar e caracterizar mais amostras fornecendo melhores dados sobre a presença e o envolvimento patogênico dos RVs-D em aves, aumentando o conhecimento acerca desse agente viral.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. ROTAVÍRUS

Os rotavírus pertencem a família Reoviridae, gênero *Rotavirus*. Possuem uma tripla camada protéica, constituindo os capsídeos interno, intermediário e externo, com 60 espículas distribuídas na superfície. A partícula viral é icosaédrica, não envelopada, medindo cerca de 100nm quando a partícula é íntegra e infectiva (Figura 1).

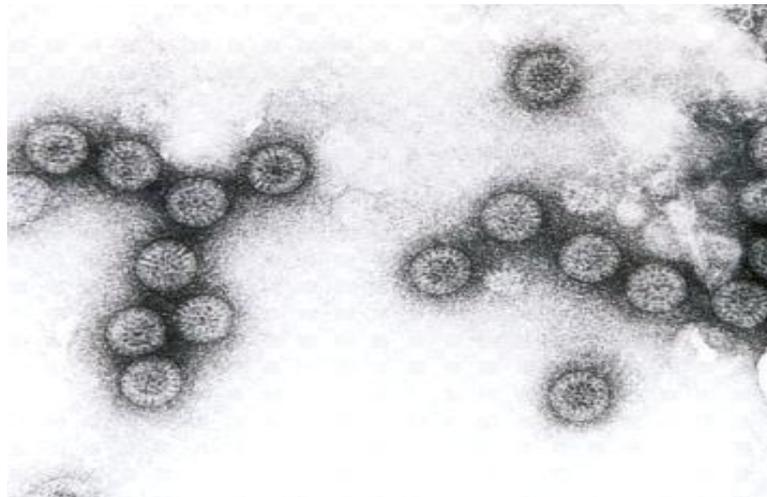


Figura 1. Micrografia eletrônica do rotavírus.
Cortesia de Dr^a. Yvone Gabbay, IEC, 2004.

O genoma é formado por 18.556 pares de base (pb) (ESTES, 2001; KAPIKIAN et al., 2001). Cada segmento genômico (ou gene) regula a síntese de uma proteína viral específica, sendo seis proteínas estruturais, denominadas de “viral proteins” (VPs): VP1-VP4, VP6 e VP7, e seis não estruturais, as “non structural proteins” (NSPs): NSP1-NSP6 (Quadro 1).

As proteínas NSP5 e NSP6 são exceção, já que são codificadas pela região de sobreposição de um único segmento. (ESTES 2001; SANTOS e SOARES, 2008).

Segmento Genômico	Proteína	Localização	Função
1	VP1	Core	RNA polimerase- RNA dependente
2	VP2	Core	Ligação ao RNA viral
3	VP3	Core	Guanililtransferase
4	VP4 (VP5* e VP8*)	Capsídeo externo	Hemaglutinina, proteína de ligação á célula, peptídeo de fusão, antígeno neutralizante
5	NSP1	Não-estrutural	Ligação ao RNA viral
6	VP6	Capsídeo interno	Antígeno de subgrupo necessário para a transcrição
7	NSP3	Não-estrutural	Inibe a tradução de proteínas celulares, ligação ao terminal do mRNA viral
8	NSP2	Não-estrutural	Ligação ao RNA, helicase, NTPase, forma viroplasmas com NSP5
9	VP7	Capsídeo externo	Glicoproteína antígeno neutralizante
10	NSP4	Não-estrutural	Glicoproteína, papel na morfogênese, modula cálcio intracelular, enterotoxina
11	NSP5	Não-estrutural	Ligação ao RNA, forma viroplasma com NSP2, interage com VP2 e NSP6
	NSP6	Não-estrutural	Interage com NSP5, presente no viroplasma

Quadro 1. Localização e função das proteínas dos rotavírus. **Fonte:** Santos e Soares, (2008).

As proteínas VP1, VP2 e VP3 estão associadas ao processo de revestimento do genoma viral. A VP6 constitui o capsídeo interno, associando-se à transcrição do RNA viral, bem como à entrada na célula hospedeira.

A VP4 e VP7 compõem o capsídeo externo e induzem a formação de anticorpos neutralizantes, sendo que a VP4 é clivada por ação de enzimas proteolíticas, dando origem a dois fragmentos, VP5* e VP8*, desempenhando papel importante no processo de reconhecimento do receptor (ESTES e COHEN, 1989; ESTES, 2001; KAPIKIAN et al., 2001; SANTOS e SOARES, 2008).

3.2. CLASSIFICAÇÃO EM GRUPOS

Os rotavírus são classificados em sete grupos de A a G, com a especificidade dos grupos sendo determinados predominantemente pela proteína VP6, o qual confere especificidade para grupo. Os RVs-A, RVs-B e RVs-C são encontrados em seres humanos (KRISHNAN et al., 1999; AHMED et al., 2004; BÁNYAI et al., 2006; MASCARENHAS et al., 2006; GABBAY et al., 2008; FLAHAULT e HANSLIK, 2010; KAWAI et al., 2011; LAHON e CHITAMBAR, 2011) e animais (GABBAY, et al., 2003; URSU et al., 2011; SUZUKI et al., 2011; LEE et al., 2011). Os grupos B ao G são denominados de rotavírus não grupo A ou atípicos (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Os integrantes do grupo A são os RVs mais amplamente dispersos, sendo predominantes na natureza. Contém um antígeno comum, a VP6, detectado pela maioria das técnicas sorológicas rotineiramente utilizadas como recurso diagnóstico, permitindo a classificação dos subgrupos em I, II, I+II, não-I e não-II (KAPIKIAN et al., 2001). A RT-PCR associada ao sequenciamento de nucleotídeos ou análise de polimorfismo dos fragmentos de restrição tem sido utilizada também para a classificação dos RV-A (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).

Os rotavírus do grupo B foram primeiramente relacionados com casos de diarreia em animais e posteriormente foi detectado em vários surtos de gastroenterites graves ocorridos na China envolvendo adultos e recém-nascidos. Foram também associados a quadros diarreicos em adultos na Índia, Bangladesh e Myanmar (KRISHNAN et al., 1999; AHMED et al., 2004; AUNG et al., 2009), já o

rotavírus C tem sido detectado de forma esporádica em seres humanos e animais (BÁNYAI et al., 2006; GABBAY et al., 2008).

Os rotavírus dos grupos A, D, F e G já foram detectados em espécies de aves (ESTES e KAPIKIAN, 2007), sendo os RVs D, F e G encontrados exclusivamente em aves (OTTO et al., 2006; DAY et al., 2007, OTTO et al., 2011; JOHNE et al., 2011). Estudos com os grupos D, F e G de rotavírus são poucos e somente recentemente as sequências desses agentes virais foram descritas por Trojnar et al. (2010) e Johne et al. (2011), respectivamente.

3.3. ESTRUTURA VIRAL

Estudos de partículas virais produzidas a partir da expressão gênica em baculovírus e técnicas de criomicroscopia eletrônica (crio-ME) associadas ao uso de computadores com programas para o processamento e análise de imagens permitiram revelar a estrutura tridimensional dos rotavírus, tal fato, levou ao entendimento dos aspectos funcionais em processos pela determinação das estruturas moleculares nos mecanismos virais de adsorção, penetração, replicação, liberação e neutralização (DORMITZER et al., 2004; VENKATARAMAN et al., 2006).

À microscopia eletrônica é possível se observar a partícula completa e infectiva das três camadas protéicas ou partícula com tripla camada (TLPs “Triple-Layered Particle”) de acordo com o demonstrado na Figura 2. A camada protéica mais externa é denominada de capsídeo externo que ao ser tratado com agentes quelantes como EDTA (10 nM) fica sem a camada externa e é possível observar o capsídeo interno (camada protéica interna), formada por trímeros protéicos da proteína VP6 denominada de “partícula de dupla camada” (DLPs “Double-Layered Particle”) ou partícula rugosa, devido as projeções protéicas do capsídeo interno. A outra camada observada é o core ou partícula de camada simples (SLPs “Single-Layered Particles” e está associada ao RNA genômico (ESTES e KAPIKIAN, 2007; MCCLAIN et al., 2010). O core é formado pelas proteínas VP1, VP2 e VP3, codificadas pelos segmentos 1, 2 e 3, respectivamente. As proteínas VP2 formam uma camada intermediária entre o capsídeo interno e o “subcore”, este último, constituído pelas proteínas VP1 e VP3.

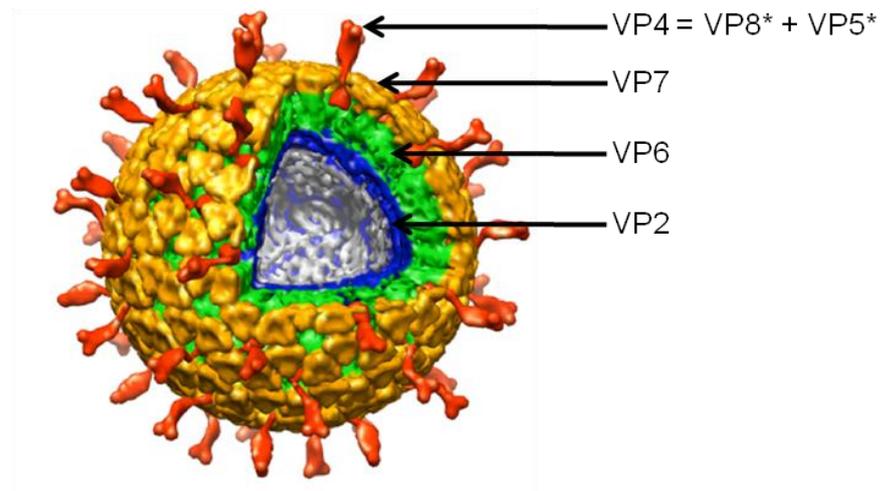


Figura 2. Partícula de rotavírus completa e infectiva (TLP), com base em reconstituições cryoEM e atribuições de densidades. As duas camadas proteicas externas estão em amarelo (VP7) e vermelho (VP5* / VP8*). A proteína da camada média (VP6) está em verde, a VP2 camada interna, na cor azul. **Fonte:** McClain et al., 2010

A camada de VP2 está associada à camada de VP6 (MCCLAIN et al., 2010) (Figura 3 e 4A), o que confere a partícula viral maior homogeneidade morfológica e estabilidade por longo prazo sugerindo assim que a maior responsável pela integridade da estrutura da partícula de rotavírus é a proteína VP6 (ZENG et al., 1994), representada na Figura 4B.

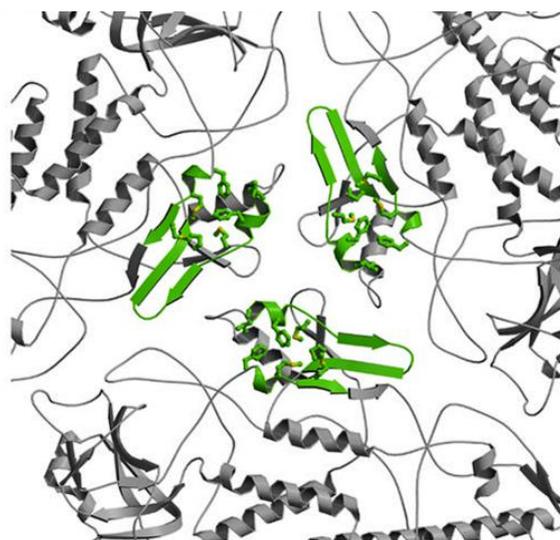


Figura 3. Interações da VP2 e VP6. Visão da camada VP2 dobrando-se (em verde) e os resíduos que têm contato direto com o trímero VP6 vinculado sobre eles. **Fonte:** McClain et al., 2010.

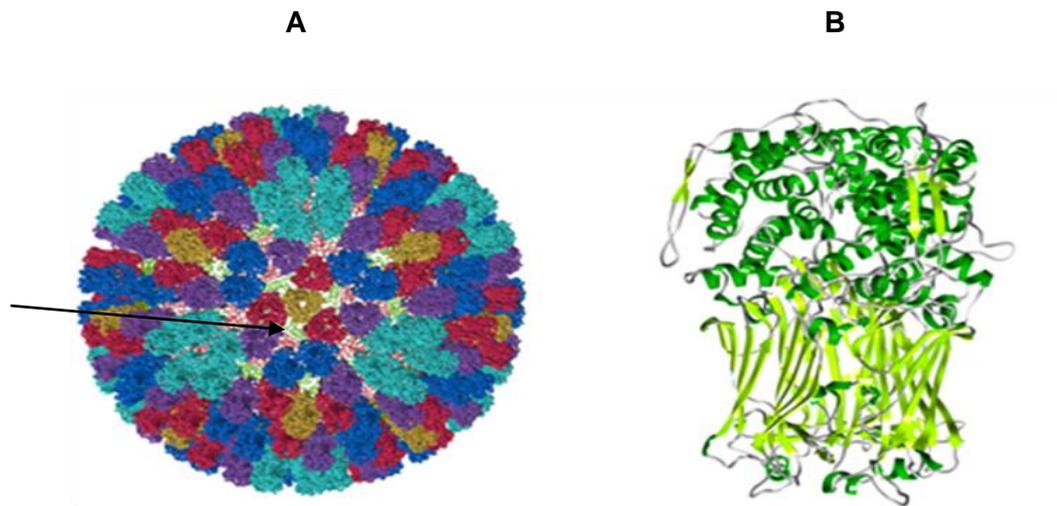


Figura 4. Representação da proteína VP6 em fita (A) e em estrutura tridimensional em B. As diferentes cores significam diferentes eixos de simetria. A camada interna (VP2) em vermelho e verde é mostrada pela seta. **Fonte:** McClain et al., 2010.

O capsídeo externo é formado por duas proteínas estruturais, VP4 e VP7 importante para a infectividade viral. A proteína VP7 (Figura 5) contém antígenos indutores de anticorpos neutralizantes, é formada por 780 moléculas protéicas dispostas em 260 trímeros agrupados em pentâmeros ou hexâmeros, que interagem com o ápice dos trímeros de VP6 (AOKI et al., 2009).

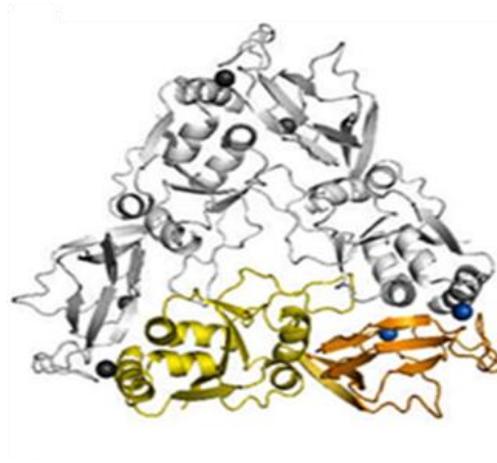


Figura 5. Representação esquemática em fita da proteína VP7 demonstrando os trímeros. **Fonte:** Aoki et al., 2009.

3.4. ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

O genoma do rotavírus é composto por 11 segmentos de RNA de fita dupla (dsRNA) com polaridade positiva, variando o tamanho de 627 pb (segmento 11) a 3302 pb (segmento 1) para o rotavírus A (ESTES e KAPIKIAN, 2007), e de 672 pb (segmento 11) a 3274 pb (segmento 1) para o rotavírus D, de acordo com o genoma completo depositado no banco de genes em estudo conduzido por Trojnar et al. (2010). O genoma total contém aproximadamente 18.550 pb e peso molecular de $2,0 \times 10^5$ a $2,0 \times 10^6$ daltons (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

Cada segmento de RNA apresenta em sua extremidade 5' uma guanidina e um conjunto de nucleotídeos de sequências conservadas, não codificadoras, seguido pelo códon de iniciação e por uma fase aberta de leitura (*ORF- open reading frame*), o qual codifica no mínimo uma proteína. No final de cada segmento há um conjunto de sequências não codificadoras, que por sua vez apresenta um conjunto de sequências conservadas terminais 3' finalizando com uma citidina na posição 3', com um códon de parada. Quase todas as extremidades dos mRNAs com sequência consenso 5'- UGUGACC- 3' contêm sinais para a expressão dos genes e replicação.

Os comprimentos das sequências não codificadoras 3' e 5' variam para os diferentes genes, e não possuem cauda poliA na extremidade 3' (Figura 6). Todos os segmentos genômicos possuem pelo menos uma ORF após o primeiro códon de iniciação AUG necessário para a síntese protéica. Todos os segmentos genômicos são monocistrônicos, com exceção do gene 11. Os dsRNAs são pareados do início ao final no sentido positivo e contém uma sequência 5' cap m^7 GppG^(m) GPY (ESTES e KAPIKIAN, 2007). O empacotamento destes segmentos genômicos no capsídeo requer interações entre proteínas e RNA (KAPAHNKE et al., 1986) (Figura 6).



AUG - códon de iniciação para a síntese protéica. 5´- sequência intensificadora, extremidade guanidina. 3´- sequência intensificadora extremidade citosina.

Figura 6. Representação esquemática da estrutura dos genes dos RVs. **Fonte:** Adaptado de Estes (2001).

Os segmentos 1, 2, 3, 4, 6 e 9 codificam respectivamente as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7, enquanto que os segmentos 5, 7, 8 e 10 codificam as proteínas não estruturais NSP1, NSP3, NSP2 e NSP4, respectivamente. Já o segmento 11 codifica as proteínas NSP5 e NSP6 (ESTES, 2001).

3.5. PERFIL ELETROFORÉTICO

A EGPA permite visualizar o genoma segmentado dos rotavírus exibindo a mobilidade de cada segmento, devido à diferença de massa molecular (Figura 7).

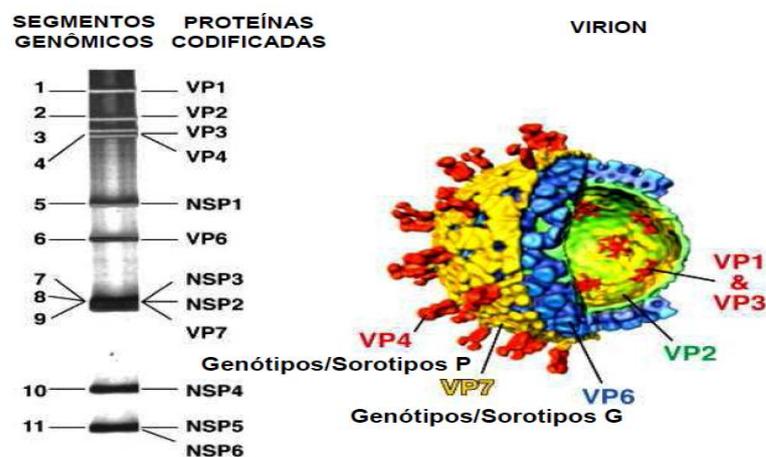


Figura 7. Representação esquemática dos segmentos dos RVs e estrutura tridimensional da partícula de rotavírus de SA11. **Fonte:** adaptado de Desselberger et al. (2009).

Os onze segmentos de dsRNA são distribuídos em 4 classes de acordo com sua ordem de migração e peso molecular. A partir da migração eletroforética e distribuição em classes, foi proposto o perfil eletroforético dos rotavírus de A-G representando na Figura 8. Também por meio da EGPA e com base na migração do 11º segmento o perfil eletroforético dos RVs-A podem ser classificados em longo, curto e super-curto (ESTES, 2001; KAPIKIAN et al., 2001)

A			B					C			D	E	F	G
Humano	Humano	Humano	Humano	Suíno	Bovino	Ovino	Murino	Humano	Suíno	Bovino	Ave	Suíno	Ave	Ave
I	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	==	==	==	==	==	==	==	==	==	==	==	==	==
	4	—	—	—	==	==	==	==	==	==	==	==	==	==
II	5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	6	—	—	—	==	==	==	==	==	==	==	==	==	==
III	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	8	==	==	==	—	—	—	==	==	==	==	—	—	—
	9	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
IV	10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	11	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Figura 8. Demonstração esquemática do padrão de migração eletroforética dos segmentos das amostras de rotavírus dos grupos A a G. **Fonte:** Adaptado de Kapikian et al. (2001).

A diversidade dos RVs provavelmente ocorre devido a três diferentes mecanismos de evolução na natureza entre diferentes cepas do RVs em diferentes hospedeiros, como pontos de mutação (drift), rearranjos genômicos (shift) e reestruturação (DESSELBERGER, 1996).

O rearranjo entre amostras distintas é possível de ocorrer devido a natureza segmentada dos RVs, podendo gerar um novo vírus. Esse rearranjo é denominado de *reassortant*, que é um dos mecanismos importantes para a evolução viral e para a geração da diversidade genética dos rotavírus (ABE et al., 2009).

A migração diferenciada na EGPA pode ser devido ao produto dos rearranjos originado provavelmente pela duplicação parcial da ORF dos RVs, ou sob a forma de deleção em função de erros no processo de transcrição pela RNA polimerase, RNA dependente de um único segmento do genoma (DESSELBERGER, 1996).

Estudos como o de Trojnar et al. (2010), descrevem diferenças entre os padrões de migração dos RVs D e A. Segundo as amostras analisadas, o grupo D tem o perfil: 5:2:2:2 (Figura 9D) e o grupo A tem o perfil 5:1:3:2 (Figura 9A).

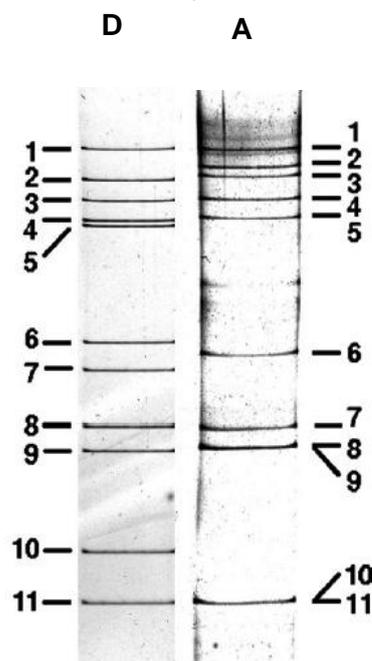


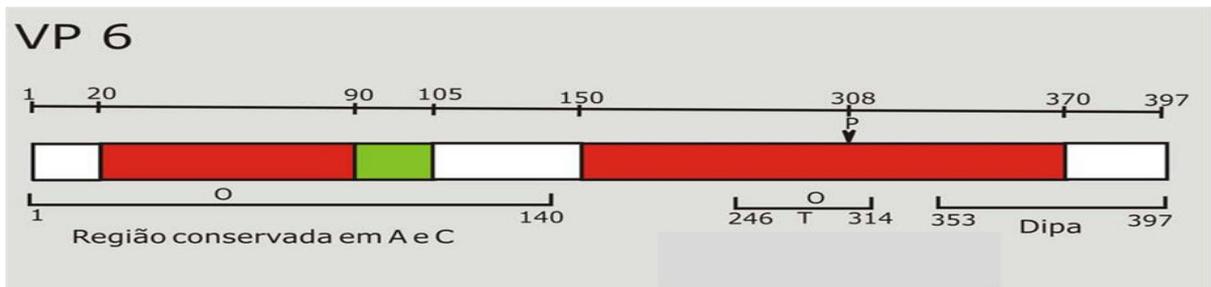
Figura 9 – Padrão de migração de rotavírus em aves dos grupos D e A. **Fonte:** Adaptado de Trojnar et al. (2010).

3.6. PROTEÍNA VP6

A proteína VP6 está localizada na camada intermediária do vírus, circunda o core e é determinante dos grupos (A, B, C, D, E, F e G) e no RV-A também determina o subgrupo. Atualmente se conhece quatro subgrupos (I, II, I e II, I + II e não I, não II) determinados por anticorpos monoclonais específicos e localizados entre os aminoácidos 296 a 259 e 305 (ITURRIZA-GÓMARA et al., 2002).

A VP6 representa 51% do vírion, apresenta peso molecular de 48 kDa e contém 396 aminoácidos (aa), sendo codificada pelo sexto segmento genômico.

Essa proteína exerce um papel importante na estrutura da partícula viral, devido à interação com as proteínas do capsídeo externo (VP4 e VP7) e a VP2, do core (PESAVENTO et al., 2006). É dotada de caráter hidrofóbico com elevado potencial antigênico, imunogênico e altamente estável. Apresenta epítomos conservados, alvo para o diagnóstico laboratorial (GORZIGLIA et. al., 1985). O domínio de trimerização se situa entre os aminoácidos 246 e 315, e o domínio necessário para a formação das partículas de camada dupla está localizado entre os aa 281 e 397 (ESTES, 2001) (Figura 10).



O – Sítio hidrofóbico. T – domínio de trimerização. Dipa – montagem da partícula de camada dupla. P – prolinas conservadas.

Figura 10. Propriedades estruturais e antigênicas da VP6 com base na seqüência de nucleotídeos e anticorpos monoclonais mostrando a proteína de 397 aa. **Fonte:** Adaptada de Estes (2001).

3.7. PROTEÍNA VP7

A VP7 é uma glicoproteína e a segunda mais abundante, constituindo aproximadamente 30% do vírion. Apresenta peso molecular de 34 kDa e é o principal componente do capsídeo externo (MATTION et al., 1994). Possui papel importante na indução de anticorpos neutralizantes e é responsável pela determinação de sorotipo específico G. Foram descritas até o presente momento 9 regiões antigênicas variáveis (VR) denominadas de VR1 a VR9, com a comparação de seqüências deduzidas por aa. As regiões VR5, VR7 e VR8 são responsáveis pela codificação de epítomos neutralizantes e correspondem as regiões A, B, e C, respectivamente. O sítio antigênico mais imunogênico da VP7 é a região C que está localizada entre os resíduos de aa 208 e 221, a região A está entre os resíduos de aa 87 e 101 e a região B entre os resíduos de aa 143 e 153, conforme demonstrado na Figura 11 (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

viral, como a utilização de células de epitélio intestinais polarizadas acompanhadas do uso da microscopia confocal (ESTES e KAPIKIAN, 2007). Diferentemente do grupo A, o grupo D não é propagado em células MA-104 (TROJNAR et al., 2010).

Os rotavírus apresentam tropismo celular *in vivo* pelos enterócitos maduros das vilosidades intestinais. A replicação ocorre no citoplasma das células absortivas diferenciadas, localizadas no terço apical das vilosidades do intestino delgado. As partículas infecciosas são liberadas no lúmen intestinal e o processo replicativo tem continuidade na área distal do intestino delgado (ESTES, 2001). O estudo realizado por Haynes et al. (1994) revela que ao contrário do rotavírus grupo A, que preferencialmente infecta as células do duodeno, o grupo D de rotavírus têm uma predileção para o jejuno e íleo, já em outros estudos há a demonstração que os RV-A também tem tropismo preferencial pela mucosa do jejuno (LUDGREN e SVENSSON, 2001).

Segundo estudos como os conduzidos por Hewish et al. (2000), Guerrero et al. (2000) e Lopez e Arias (2004) é demonstrado que a adsorção é determinada pela proteína VP4, após clivagem em dois domínios VP5* e VP8*, pela ação da tripsina pancreática. As interações se iniciam por meio de receptores celulares contendo ácido siálico e integrinas, com o domínio VP8* interagindo com o ácido siálico e o VP5* com as integrinas. A penetração da partícula viral na célula pode ocorrer diretamente via membrana plasmática do enterócito ou por endocitose; esse processo é mediado pela VP4 e auxiliado pela VP7, envolvendo os receptores contendo ácido siálico e integrina $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu\beta 3$ e $\alpha 4\beta 1$. Nesta etapa ocorre o desnudamento, perda do capsídeo externo e em seguida a liberação do cerne no citoplasma celular. A síntese do mRNA é realizada de forma ordenada; os segmentos menores são sintetizados primeiramente e os segmentos maiores posteriormente. A maioria das proteínas codificadas pelo genoma viral é sintetizada em ribossomos livres, exceto as proteínas VP7 e NSP4 que são sintetizadas em ribossomos ligados ao retículo endoplasmático rugoso (RER).

A montagem das partículas de duplo capsídeo (DLPs) envolvendo o core viral e a VP6 está associada a formação de viroplasma e a maturação final da partículas ocorre no interior do RER, na dependência de íons Ca^{2+} . As partículas de dupla camada adquirem a tripla camada (TLPs) no interior do RER brotando através da membrana. As proteínas VP4, VP6, VP7 e NSP4 são transitoriamente envelopadas durante este processo, pois ocorrem interações específicas entre elas. As partículas

recebem o capsídeo externo (VP4 e VP7) antes ou após o brotamento a partir do RER. As partículas virais completas perdem o envelope, migram para o citoplasma e em seguida são liberadas após a lise celular, infectando outros enterócitos (ESTES e KAPIKIAN, 2007, DESSELBERGER et al., 2009).

3.9. ROTAVÍRUS EM AVES- MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A cadeia produtiva da avicultura tem grande importância no agronegócio brasileiro e a avicultura se destaca dentre os diversos sistemas de produção animal como um das atividades agropecuárias mais tecnificadas. Vários fatores como genéticos, nutricionais e os ligados ao tipo de manejo zootécnico-sanitário, aliados com a evolução dos estudos científicos podem influenciar nos índices de produtividade dos plantéis de frango de corte. No aspecto sanitário as doenças infecciosas, de ocorrência tanto de forma epidêmica quanto endêmica, contribuem significativamente para a redução da taxa de desfrute dos plantéis e quando a etiologia é viral, os RVs são um dos principais responsáveis por essa redução (ALFIERI et al., 2000).

A primeira detecção de RVs em aves foi relatada nos Estados Unidos em estudo com perus diarreicos (BERGELAND et al., 1977). No Brasil, a primeira detecção foi em frangos de corte em 1988 (ALFIERI et al., 1988). Os rotavírus em aves ocasionam distúrbios como enterite, diarreia, desidratação, fraqueza, anorexia, redução na taxa de conversão alimentar e no ganho de peso, depressão da taxa de crescimento, perda de uniformidade do rebanho. Também estão relacionados ao aumento da susceptibilidade a outras doenças gerando aumento no custo das medicações, na taxa de mortalidade e queda na produção de ovos, levando a sérios prejuízos econômicos aos produtores (YASON e SCHAT, 1987; LEGROTTAGLIE et al., 1997; TAMEHIRO et al., 2003; ELSCHNER et al., 2005).

Os RVs podem ser isolados de animais com manifestações clínicas ou assintomáticos, sendo que a possibilidade de diagnóstico positivo para RVs aumenta consideravelmente na análise de amostras pastosas e diarreicas (TAMEHIRO et al., 2003). O contrário já foi observado por Vilarreal et al. (2006) que relatam não haver

diferenças significativas para a detecção de rotavírus ao analisarem amostras de plantéis com e sem diarreia.

Em infecção experimental com perus e frangos foi verificado que os perus foram mais sensíveis a infecção com RVs do que os frangos (YASON e SCHAT, 1987) e relataram que a presença de episódios diarreicos em frangos é rara, diferentemente, do observado em perus (BARRIOS et al., 1991). O estudo realizado por Legrottaglie et al. (1997) constatou maior positividade de material genômico do vírus em amostras fecais de frangos assintomáticos do que em aves com sintomatologia (OTTO et al., 2006; VILARREAL et al., 2006).

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

- Investigar a ocorrência de rotavírus do grupo D em aves criadas em granjas situadas na Mesorregião Metropolitana de Belém, no período compreendido entre 2008 a 2011.

4.2. ESPECÍFICOS

- Detectar rotavírus do grupo D em espécimes fecais de aves;
- Identificar os eletroferotipos de RVs-D;
- Verificar a frequência de rotavírus do grupo D na Mesoregião amostrada;
- Comparar as técnicas de EGPA e RT-PCR para a detecção;
- Verificar a frequência de RVs-D por faixa etária;
- Descrever as sequências dos genes VP6 e VP7 dos RVs-D identificando a diversidade genética dos fragmentos sequenciados.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDO

A área de escolha para o desenvolvimento do presente estudo foi a Mesorregião Metropolitana de Belém Pará. Nessa Mesorregião, a avicultura possui posição de destaque no cenário produtivo do estado do Pará segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2006). De acordo com a Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARÁ, 2006), existem 182 granjas cadastradas nesta Mesorregião, que é composta por 11 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 12).



Figura 12. Municípios em que foram realizadas as colheitas das amostras. **Fonte:** Adaptado de Google Earth

5.2. COLHEITA DAS AMOSTRAS

A colheita das amostras foi realizada a partir do material fecal de espécies de aves do gênero *Gallus*, em 37 granjas de pequeno, médio e grande porte, distribuídas na Mesorregião Metropolitana de Belém e em no mínimo 30% dos galpões (lotes) de acordo com o número existentes na granja. Foi coletado material fecal (amostras fecais depositadas sobre as camas) pertencente a nove pontos distintos de cada lote aviário, o que correspondeu a uma amostra, sendo representativa da população daquele lote. Após a colheita as amostras foram mantidas sob refrigeração em recipientes estéreis até sua chegada a Seção de Virologia (Laboratório de Rotavírus) do Instituto Evandro Chagas, onde foram mantidas a -20°C até seu processamento. A representação esquemática da colheita é apresentada na Figura 13 e o lote aviário é mostrado na Figura 14.

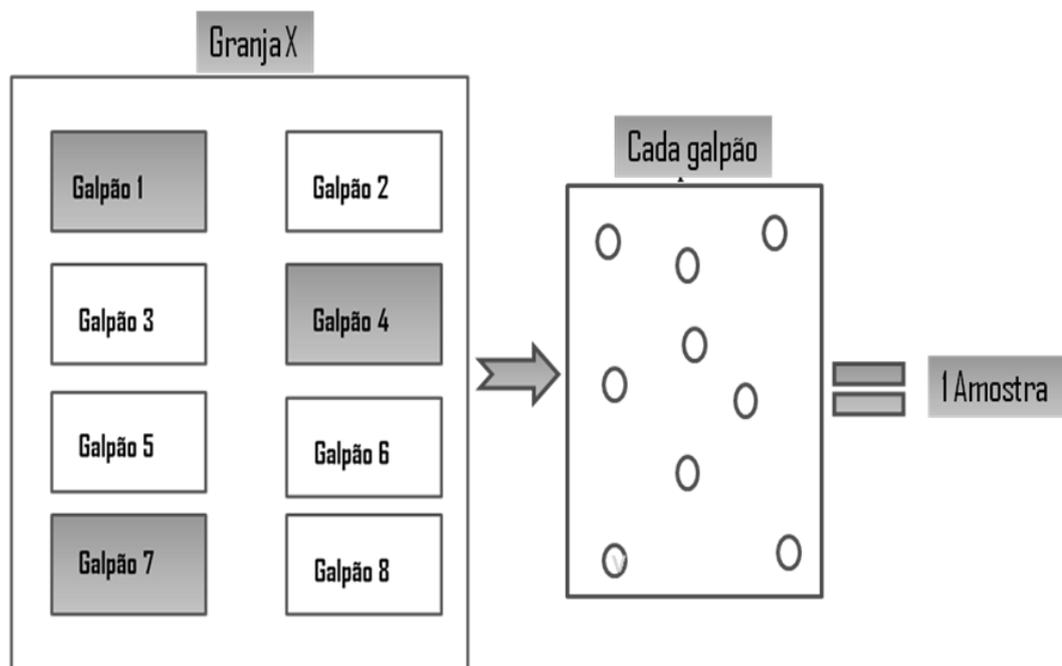


Figura 13. Representação esquemática da colheita realizada em no mínimo 30% dos galpões, em 9 pontos distintos de cada galpão, equivalendo a 1 amostra.



Figura 14. Lote aviário em que foi realizada uma das colheitas.

5.3. SUSPENSÕES FECAIS

As amostras contendo os pools fecais foram diluídas em volume de 2:5 (v/v) em tampão fosfato (PBS) pH 7,4 acrescida de clorofórmio, submetidas a homogeneização sob agitação durante 20 minutos. As suspensões foram centrifugadas a 2.500 rpm por 10 minutos e o sobrenadante, coletado e estocando-o a -20 °C (Figura 15).



Figura 15. Representação esquemática do preparo das suspensões fecais

5.4. EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL

O genoma viral foi extraído a partir das suspensões fecais de acordo com o método descrito por Boom et al. (1990). A técnica é esquematizada resumidamente na Figura 16.

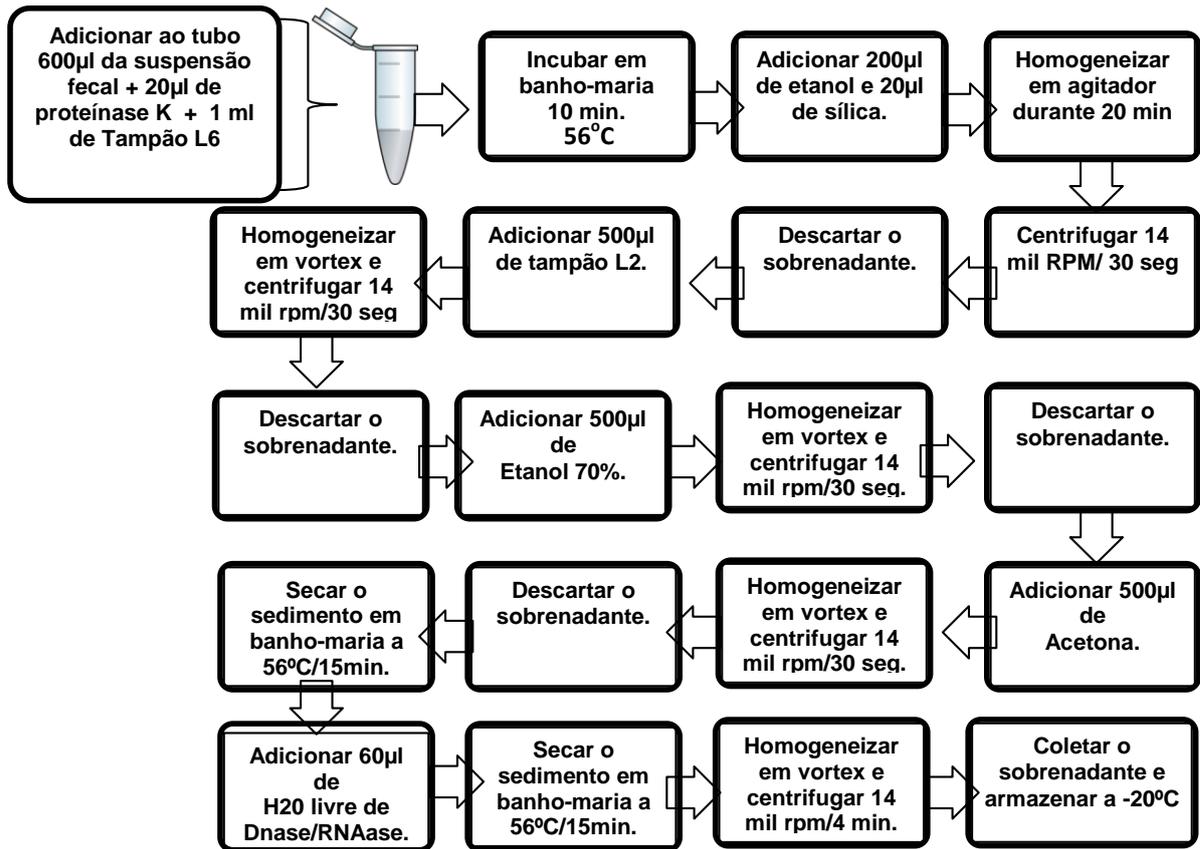


Figura 16. Representação esquemática da extração do genoma viral.

5.5. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA)

Os dsRNA extraídos foram submetidos à EGPA segundo a técnica desenvolvida por Pereira et al. (1983) visando à detecção do grupo D de RVs bem como a análise dos perfis eletroforéticos.

Dez microlitros de cada dsRNA extraído foi misturado a 2 μ l de azul de bromofenol e aplicado a cada orifício do gel de poliacrilamida na concentração de 5%. O gel foi submetido à eletroforese vertical a 100 Volts, 100 Watts e 21 milli-Ampères por 2 a 4 horas, aproximadamente (Figura 17). Após a corrida, o gel foi retirado da cuba e as bandas virais fixadas com o uso de etanol e ácido acético, coradas com nitrato de prata e reveladas utilizando-se hidróxido de sódio 10M e formaldeído. O padrão eletroforético foi visualizado em negatoscópio de luz branca.

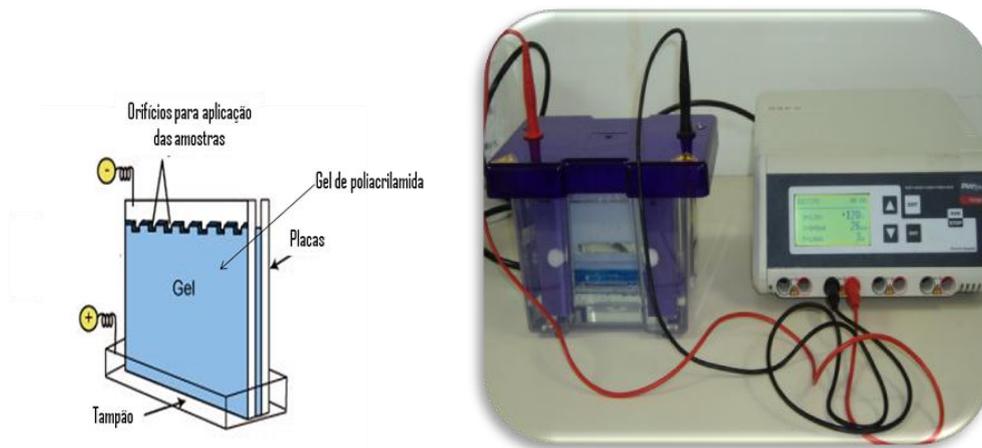


Figura 17. Representação esquemática da Eletroforese em Gel de Poliacrilamida .

5.6. BIOLOGIA MOLECULAR

5.6.1. Construção dos iniciadores

Baseado nas sequências reportadas por Trojnar et al., (2010) foram construídos iniciadores específicos para os genes que codificam as proteínas VP6 e VP7 do RVs-D usando o programa Primer BLAST disponível no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). São mostrados nas Figuras 18 e 19 e no Quadro 2.

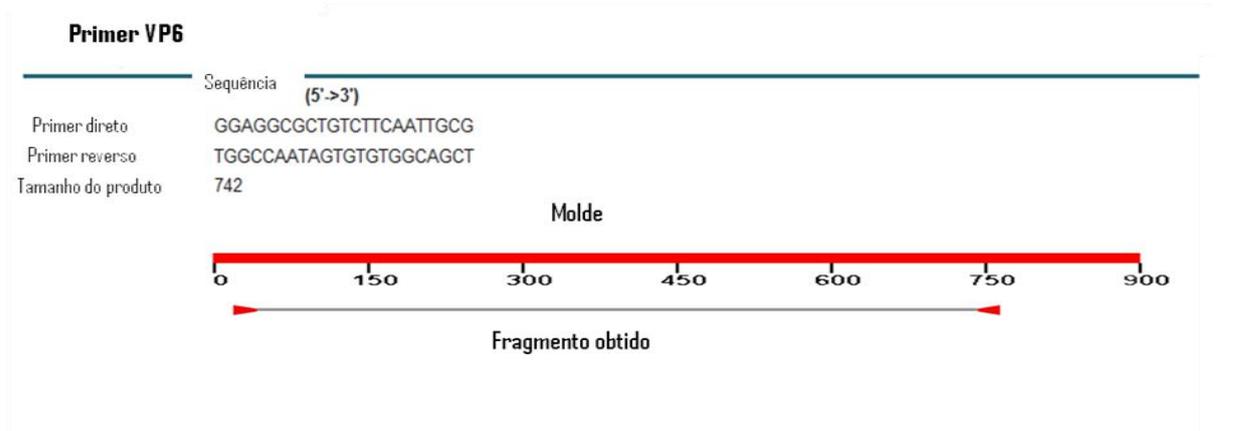


Figura 18. Sequência nucleotídica para os iniciadores RD6F e RD6R do gene VP6 de RVs-D.

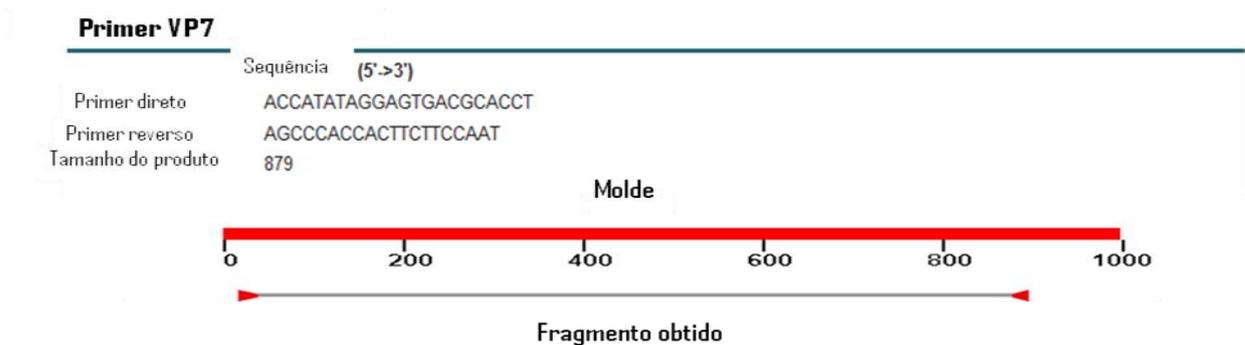


Figura 19. Sequência nucleotídica para os iniciadores RD9F e RD9R do gene VP7 de RVs-D.

Iniciadores	Sequência 5'-3'	Gene	Fragmento amplificado (pb)*
RD6F (+)	GGAGGCGCTGTCTTCAATTGCG	VP6	742
RD6R (-)	TGGCCAATAGTGTGTGGCAGCT		
RD9F (+)	ACCATATAGGAGTGACGCACCT	VP7	879
RD9R (-)	AGCCCACCACTTCTTCCAAT		

RD6F(+): RVs-D segmento 6 Forward (direto); RD6R(-): RVs-D segmento 6 Reverse (reverso); RD9F(+): RVs-D segmento 9 Forward (direto) e RD9R(-): RVs-D segmento 9 Reverse (reverso).

Quadro 2. Primers sintetizados para os genes que codificam as proteínas VP6 e VP7 de RVs-D

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

A RT-PCR foi conduzida em dois estágios e realizada com os iniciadores RD6F, RD6R, RD9F e RD9R. A desnaturação da fita dupla de RNA foi realizada a 97°C durante 5 minutos seguidos de choque em gelo durante 5 minutos. Para a obtenção do cDNA 3 µL do dsRNA extraído foi adicionado ao par de iniciadores. A transcrição reversa foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 16,5 µL de H₂O livre de RNase e DNase, 2,5 µL de tampão 10x (Invitrogen^R), 1 µL de dNTPs (10 mM Invitrogen^R) 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen^R), 0,25 µL de RT (20 U, Invitrogen^R), e 0,5 µL de cada primer (20 mM, Invitrogen^R). A reação foi incubada a 42°C por 1 hora.

A PCR foi conduzida acrescentando 25 µL do reagente da PCR à amostra de cDNA para reação com volume final de 50 µL. Os reagentes da PCR incluem 18,5 µL de H₂O livre de RNase e DNase, 2,5 µL de 10x First-Stand Buffer, 3 µL de dNTPs (10 mM), 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,25 µL de Taq DNA polymerase (2,5 U/µL), com as condições de ciclagem a seguir: 93°C por 3 min (desnaturação), 35

ciclos de 93°C por 1 min (desnaturação), 55°C (anelamento) de 1 min, e 72°C por 1 min (extensão), com a incubação final de 68°C por 7 min.

5.6.3. Eletroforese em Gel de Agarose

A análise dos produtos da RT-PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % em tampão tris base, ácido bórico EDTA (0,5M) e H₂O livre de RNAase e DNAase (TBE). Após completa dissolução do gel por aquecimento em microondas durante aproximadamente um min a uma temperatura de 50°C, seguida de resfriamento à TA, foi adicionado 1µl de SYBR Safe DNA gel (Invitrogen^R) para cada 10 ml de agarose/TBE, aguardando-se em seguida, a completa solidificação do gel em cuba de eletroforese horizontal (SIGMA^R). Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese durante 60 min e a uma voltagem e amperagem médias de 120 V e 400 mA, respectivamente. A visualização da banda foi realizada utilizando o instrumento GEL DOC 1000.

O organograma geral dos procedimentos realizados na RT-PCR é representado na Figura 20.

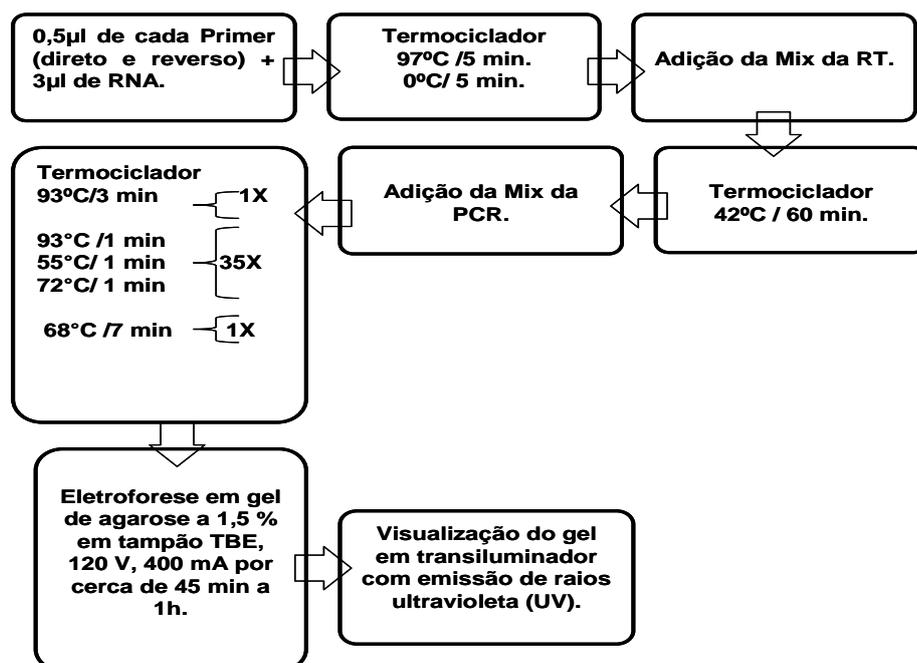


Figura 20. Organograma da RT-PCR para os genes VP6 e VP7 de RVs-D

5.6.4. Clonagem e Sequenciamento

Para a clonagem foram selecionados cinco fragmentos amplificados por RT-PCR para os genes VP6 e VP7, pertencentes a amostras oriundas de cinco municípios diferentes. A clonagem foi realizada utilizando o Kit TOPO TA Cloning (Invitrogen^R) de acordo com o protocolo do fabricante. Para a transformação por choque térmico das células competentes *E. coli* DH5 α foram usados 5 μ L da ligação. As bactérias transformadas foram plaqueadas no meio Luria-Bertani medium (LB), contendo ampicillina (100 mg/ml) mais IPTG (0,1 mM) e X-Gal (20 μ g/mL). As colônias recombinantes, identificadas pela coloração branca foram transferidas para o meio líquido LB contendo ampicilina (100 mg/ml), incubadas a 37°C por 12 hrs a 250 rpm e submetidas à PCR com os iniciadores específicos para os genes VP6 e VP7 utilizando as mesmas condições descritas anteriormente afim de confirmar a presença do inserto.

As amplificações foram purificadas usando o kit QIAquick[®] PCR Purification, de acordo com a metodologia do fabricante. Após purificação dos amplicons foi realizado o sequenciamento de nucleotídeos com os iniciadores usados na RT-PCR utilizando-se o Kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) com o uso do sequenciador automático ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems). Uma amostra positiva de cada município foi incluída nessa análise.

5.6.5. Análise das sequências

As sequências obtidas para os genes VP6 e VP7 foram alinhadas e editadas utilizando-se o programa BioEdit (V.7.0.5.3) e comparadas com sequências disponíveis no banco de genes “Genbank” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), a partir do programa BLAST. Os dendrogramas foram construídos empregando-se o programa MEGA (v.5.05), pelo método de “Neighbor-Joining”, baseado nos parâmetros de Kimura, (1980), utilizando-se o teste de confiabilidade não paramétrico de “bootstrap” com 2000 réplicas.

5.6.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares Microsoft Excel 2007 e BioEstat 5.0 (Ayres et al., 2007) para avaliar os dados obtidos. O Teste Binomial para duas Amostras Independentes foi utilizado para comparar as proporções de amostras positivas pelos métodos de EGPA e RT-PCR. Para avaliar a Sensibilidade e a Especificidade dos métodos empregados na detecção do vírus, foi utilizado o Screening test ou “Teste do Crivo”, bem como a curva “Receiver Operating Characteristic” (ROC) para determinar qual método é mais eficiente no diagnóstico. Para identificar o intervalo de idade em que houve maior frequência de infecção e confirmar a predileção do vírus por determinada faixa etária, foram aplicados os Testes Binomial para uma Amostra e Qui-Quadrado de Aderência. Em todos os testes, o nível alfa de 0,05 foi considerado para detectar diferenças estatisticamente significantes.

6. ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto Evandro Chagas aprovou o referido projeto sob o número 0004/2007 (Apêndice I). Os responsáveis pelas granjas assinaram o termo de anuência (Apêndice II), permitindo a visita dos pesquisadores no estabelecimento para a colheita dos espécimes fecais, viabilizando assim a realização da pesquisa. Os dados dos estabelecimentos serão mantidos em sigilo e os resultados somente serão utilizados com finalidade de pesquisa.

As exigências de biossegurança foram obedecidas quando da colheita dos espécimes fecais com o cuidado e atenção às medidas apropriadas para a proteção dos operadores: Equipamentos de Proteção Individual (botas, luvas, máscaras, macacão, gorros, jalecos e óculos), além da incineração dos produtos descartáveis gerados durante as colheitas. Procurou-se oferecer riscos mínimos aos animais, visto que a técnica de colheita dos espécimes fecais utilizada não exige contenção ou manipulação direta das aves, uma vez que a forma de colheita dos espécimes fecais não agride os mesmos, pois essas aves passam por estresses superiores durante a captura e transporte para o abatedouro.

Os procedimentos técnicos de manipulação das amostras, tais como o preparo das suspensões fecais seguidas de extração do RNA viral que viabiliza a pesquisa de rotavírus, foram realizados em cabine de nível de segurança biológica classe 2 B II. Os resíduos das amostras foram acondicionados em caixa para descarte de material contaminado e enviados para o incinerador do Instituto Evandro Chagas (IEC). As amostras foram armazenadas em freezer -20°C ou -70°C e ficarão sob responsabilidade do Instituto Evandro Chagas.

7. RESULTADOS

7.1. DETECÇÃO DO RVS-D POR EGPA

No período de outubro de 2008 a maio de 2011 foram coletados 85 pools de material fecal de espécimes de aves do gênero *Gallus*, que correspondeu a 85 amostras fecais. Todos os espécimes foram analisados por EGPA e foi possível se observar 14 amostras positivas (16,5%) com perfil eletroforético condizente com os apresentados por RVs-D, ou seja, exibindo o padrão de migração 5:2:2:2. Na Figura 21 pode-se observar o perfil eletroforético dos RVs-D encontrados nas amostras estudadas. Vale ressaltar que todos os eletroferotipos foram semelhantes nas 14 amostras analisadas.

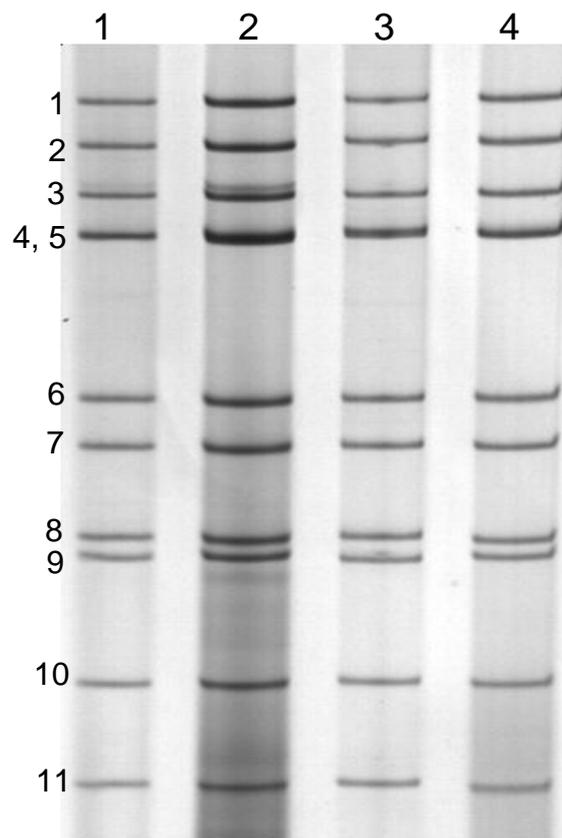
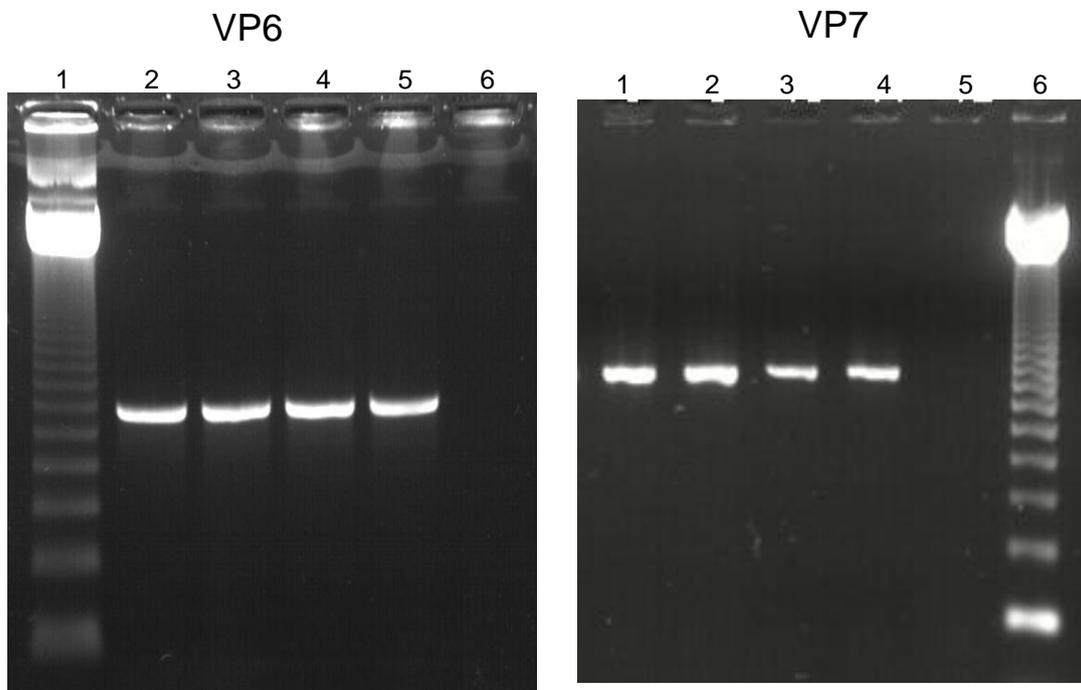


Figura 21. Perfil eletroforético dos RVs-D demonstrados por eletroforese em gel de poliacrilamida (colunas 1 a 4).

7.2. DETECÇÃO DO RVS-D POR RT-PCR

As 14 amostras que exibiram padrão de migração de RVs-D foram testadas por RT-PCR para os genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7 confirmando a presença de RVs-D em todas as amostras, pela amplificando de fragmentos de 742 pb e 879 pb, respectivamente. As 71 amostras negativas por EGPA também foram testadas por RT-PCR e o teste demonstrou positividade em 16 amostras. Portanto, do total de 85 amostras testadas por RT-PCR, 30 amostras (35,3%) foram positivas. As ampliações parciais dos genes que codificam para as proteínas VP6 e VP7 são mostradas na Figura 22.



VP6- Amplificação do gene VP6 de RVs-D, mostrando um fragmento de 742pb (colunas 2 a 5), RVs-A usado como controle negativo (coluna 6) e peso molecular de 123pb (coluna 1).

VP7- Amplificação do gene VP7 de RVs-D, mostrando um fragmento de 879pb (colunas 1 a 4), RVs-A usado como controle negativo (coluna 5) e peso molecular de 123pb (coluna 6).

Figura 22. RT-PCR para a amplificação do gene VP6 e VP7 de RVs-D

7.3. POSITIVIDADE POR MUNICÍPIOS E GRANJAS

Dos oito municípios estudados, sete apresentaram amostras positivas para RVs-D. Dentre as 37 granjas pertencentes a esses municípios foi observado a presença dessa infecção viral em 17 (45,9%) das granjas estudadas Figura 23. Inhagapi foi o município em que o RVs-D foi observado com maior frequência (85,7%) dentre os municípios estudados e Belém, foi o município em que não foi encontrada nenhuma amostra positiva (0%). A Figura 23 mostra a positividade por RT-PCR e EGPA nas amostras obtidas de cada município.



Figura 23. Positividade de RVs-D nas granjas estudadas.

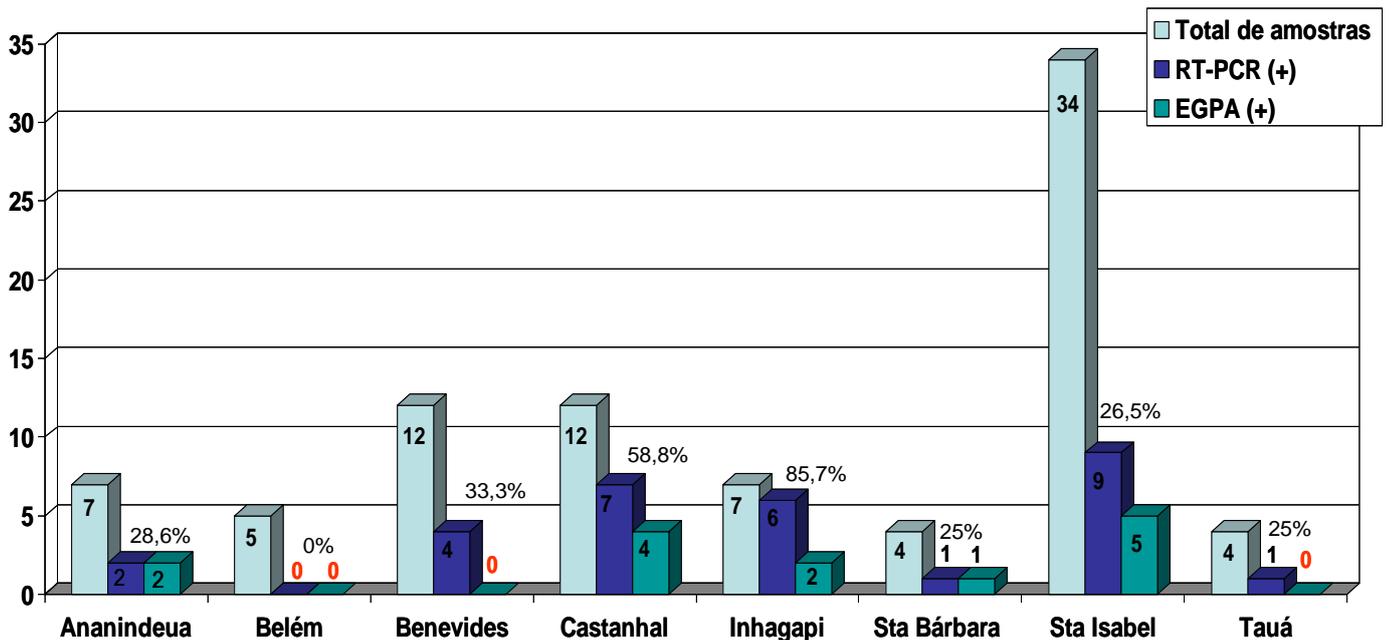


Figura 24. Positividade encontrada para RVs-D por município utilizando as técnicas de EGPA e RT-PCR.

7.4. COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE EGPA E RT-PCR

O teste binomial para 2 proporções comparando a proporção de amostras positivas pelos dois métodos demonstrou $p < 0,003$ indicando que a diferença entre as proporções de amostras positivas pelo EGPA (16,5%) e por RT-PCR (35,3%) foi ~~mu~~ muito significativa estatisticamente. O “Screening test” revelou a RT-PCR como padrão ouro demonstrando especificidade de 77,46% e sensibilidade de 100% quando comparado com a EGPA cuja, sensibilidade foi de 46,67%. Os dados positivos e negativos de cada teste são mostrados no Quadro 3. A curva ROC demonstrou o valor de distancia (d) para o teste A (EGPA) de 0,53 e para o teste B o valor de 0,23, indicando o teste B como o de melhor desempenho (Figura 25).

Quadro 3. Comparação das técnicas de EGPA e RT-PCR para detecção de RVs-D.

EGPA	RT-PCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	14	0	14 (16,5%)
Negativo	16	55	71
Total	30 (35,3%)	55	85

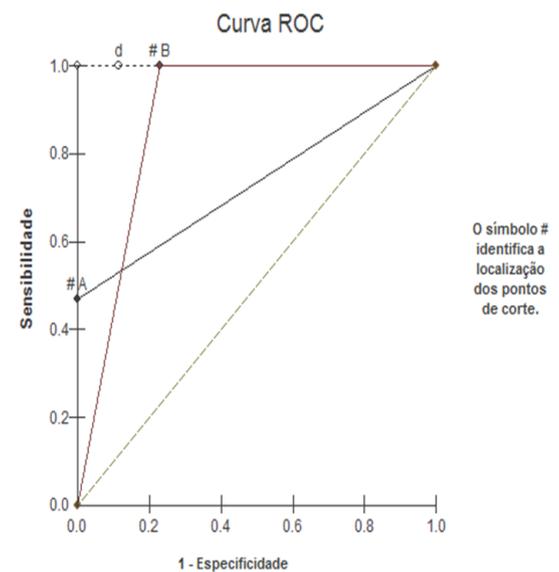


Figura 25. Curva ROC demonstrando sensibilidade e especificidade para os métodos de EGPA (A) e RT-PCR (B).

7.5. FREQUÊNCIA EM RELAÇÃO A IDADE

Em nosso estudo o intervalo de idade em que o RVs-D foi detectado com maior frequência foi o de aves com idades entre 16 a 30 dias em 23/37 ($p = 0,0003$), 62% do total de amostras colhidas nesta faixa etária equivalendo à 76,7% (23/30) das amostras positivas. Esta frequência foi significativamente maior do que o observado nos grupos etários de 0-15 e 31-45 (teste binomial, $p = 0,035$ e $p = 0,003$, respectivamente). o χ^2 de aderência em relação da infecção de RVs-D com as faixas etárias resultou em $\chi^2 = 26,6$; $gl = 2$; $p < 0,0001$. Na Tabela 1 é indicada positividade em frangos de corte com relação à faixa etária de idade em dias

IDADE EM DIAS	Amostras colhidas	Amostras positivas	p valor
0-15	11	1 (9%)	0,035
16-30	37	23 (62%)	0,0003
31-45	37	6 (16%)	0,008
TOTAL	85	30	< 0,05

Tabela 1- positividade para RVs-D associadas com a idade de frangos de corte da Mesorregião metropolitana de Belém-Pará.

7.5. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

7.5.1 VP6

Para a construção do dendrograma foram comparadas sequências de rotavírus do grupo A, tanto de origem humana quanto animal, e a sequência protótipo de rotavírus dos grupos D (chicken/05V0049/DEU/2005 [GU733448]), F (chicken/03V0568/DEU/2003 [HQ403603]) e G (chicken/03V0567/DEU/2003 [HQ403604]). A análise englobou todo o fragmento de 742 pb amplificado na RT-PCR, correspondendo aos nucleotídeos 3 a 744 da região codificadora do gene *VP6* usando-se como referência o protótipo do grupo D.

As sequências nucleotídicas de sete amostras foram analisadas e classificadas como pertencentes ao grupo D de rotavírus com *bootstrap* de 100 corroborando com esse agrupamento (Figura 26). Estas sequências apresentaram 90,8-91,3% de similaridade com o protótipo deste grupo e 98,5-99,9% de similaridade quando comparadas entre

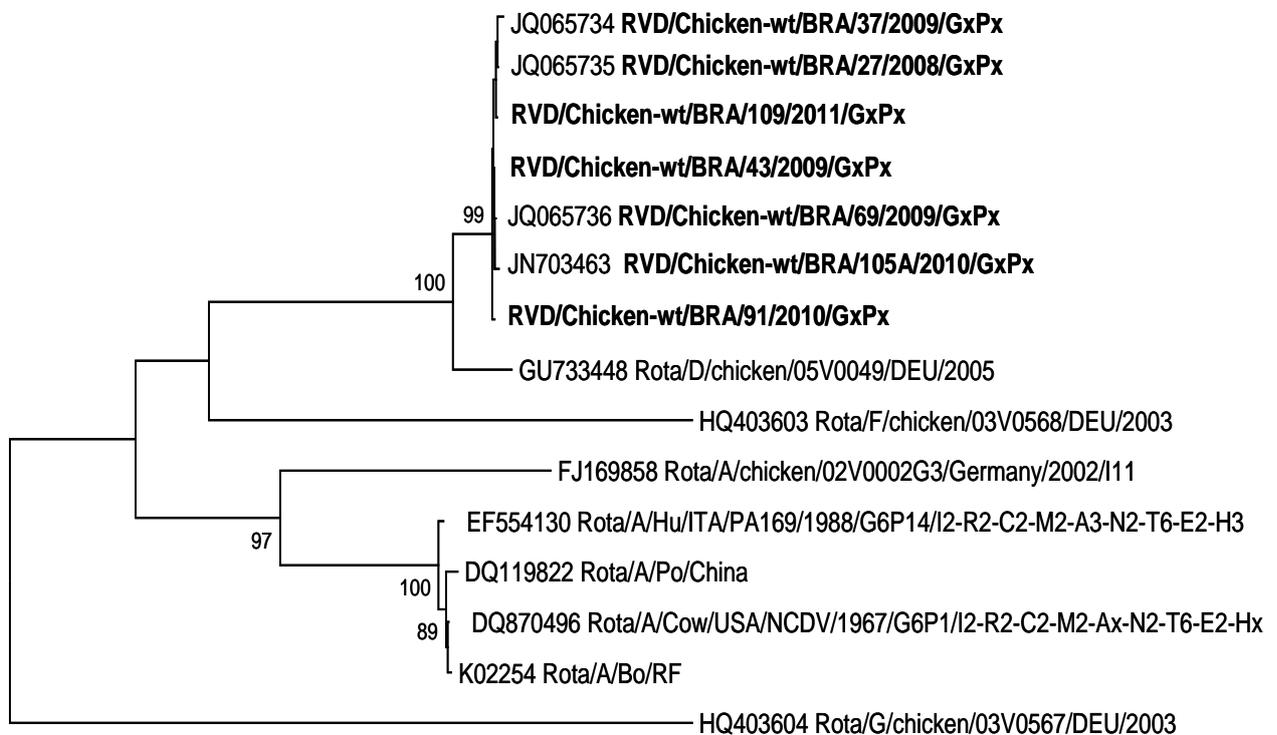


Figura 26. Dendrograma baseado na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP6 envolvendo 7 amostras da Mesorregião metropolitana de Belém e protótipos. Os valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados.

7.5.2 VP7

Para a construção do dendrograma do gene *VP7* foram comparadas sequências de rotavírus, tanto de origem humana quanto animal, pertencentes aos grupos A, B, C e D. A análise englobou o fragmento de 841 pb correspondendo aos nucleotídeos 1 a 841 da região codificadora do gene *VP7* usando-se como referência o protótipo do grupo D (GU733451/RVD/chicken/05V0049/DEU/2005).

Para o gene *VP7*, as sete amostras do presente estudo foram classificadas como pertencentes ao grupo D de rotavírus, com *bootstrap* de 100 corroborando com esse agrupamento (Figura 27). Estas sequências apresentaram 87-96,1% de similaridade com o protótipo deste grupo. Entre si, as amostras de Belém foram 94,1-100% similares.

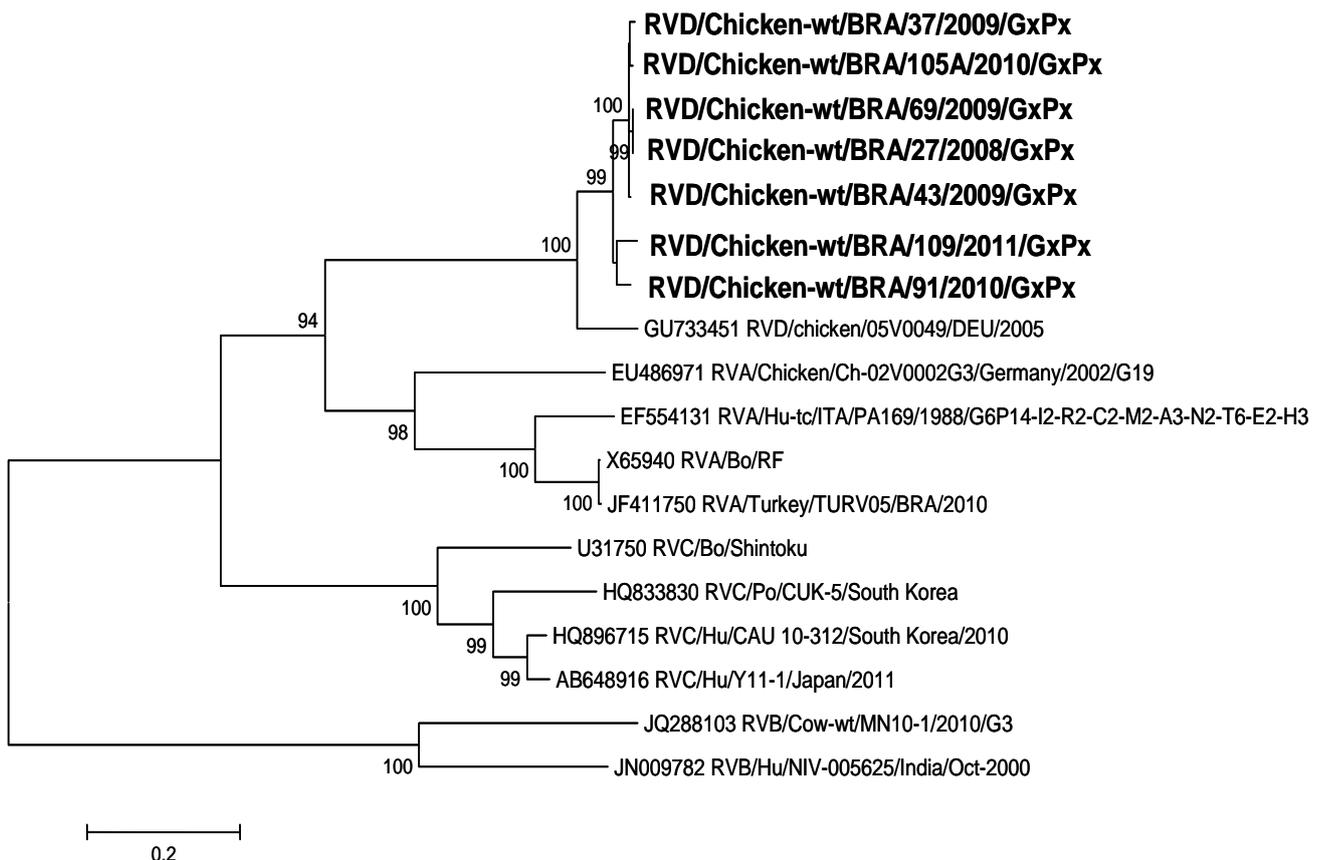


Figura 27. Dendrograma baseado na sequência nucleotídica do gene que codifica para a proteína VP7 envolvendo 7 amostras da Mesorregião metropolitana de Belém e protótipos. Os valores de *bootstrap* (2.000 pseudoréplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados.

A análise da sequência de aminoácidos para o gene *VP7* revelou relativa divergência entre o protótipo do grupo D e as amostras da mesoregião metropolitana de Belém. Tal divergência, provavelmente foi reflexo de diversas substituições aminoacídicas observadas na presente análise. Dentre as amostras deste estudo, a similaridade aminoacídica variou 96,5-100%, havendo substituições únicas em algumas amostras (Quadro 3). A similaridade nucleotídica foi de 88,6-91,3%. O alinhamento de aminoácido de todo o fragmento analisado encontra-se no apêndice III.

		1 2 2 2 3 2 2
		1 2 2 2 2 2 2 2 3 3 4 4 5 5 6 7 8 0 1 1 1 2 2 2 3 4 5 5 5 7 8 1 1 1 2 3 3 3 6 7
		1 2 1 2 5 7 8 9 0 9 6 9 3 4 0 4 3 5 2 3 4 0 1 4 8 8 0 6 9 1 0 1 7 8 2 3 4 6 2 3
	
RVD/Av/05V0049	Y I L V I R V V N L I A V A N T T M S I E D K C N V M D N K S A I I N T S S I N	
RD109-Sto Tauá	. V V L ? ? ? ? V V L I . A . . . M D N R . Y I . E D R . V V . . S T N . ?	
RD91-Sta Isabel	. V A L V K I L . V V L I . A S . . . M D N E D R L V V L D S T N . H	
RD105-Castanhal	. V A L V K I L S V V L I . A . A . . M D N . . Y . . E D R I V V . D S T N . Y	
RD27-Ananindeua	. V A L V K I L S V V L I T A . A . . M D N . . Y . . E D R L V V . D S T N T Y	
RD69-Sta Bárbara	. V A L V K I L S V V L I T A . A . . M D N . . Y . . E D R L V V . D S T N T Y	
RD43-Benevides	. V A L V K I L S V V L I . A . A . . M D N . . Y . . E D R L V V . D S T N . Y	
RD37-Inhagapi	F V A L V K I L S V V L I . A . A . L M D N . R Y . . E D R L V V . D S T N . Y	

Quadro 4. Divergência encontrada de aminoácidos das cepas de rotavírus aviário da mesoregião metropolitana de Belém com o protótipo RVs-D 05V0049 Os pontos indicam similaridade com 05V0049 e (?) Indicam sequência não determinada. Os números acima de seqüências indicam a posição do aminoácido na proteína VP7.

8. DISCUSSÃO

A presença de RVs-D tem sido documentada em aves principalmente em frangos e perus, devido sua importância no âmbito econômico e comercial (OTTO et al., 2006; KARIN et al., 2007; SAVITA et al., 2008; ISLAN et al., 2009; OTTO et al., 2011). Essa detecção baseava-se essencialmente na EGPA, já que o perfil eletroforético exibido por essa técnica é característico, possui especificidade relativamente alta, portanto permitindo classificá-los em grupos. Entretanto é problemático devido a baixa sensibilidade (OTTO et al., 2011) e possível ocorrência de rearranjos (DESSELBERGER, 1996). Mais recentemente, com a descrição da sequência completa dos RVs-D por TROJNAR et al., (2010), foi possível o desenvolvimento de novas técnicas moleculares de detecção para os RVs-D como a RT-PCR e o PCR em tempo real (OTTO et al., 2011) bem como a RT-PCR para os genes VP6 e VP7 como no estudo aqui apresentado, visando à busca da real frequência do grupo D de RVs.

No presente estudo, iniciadores específicos foram construídos para amplificar parcialmente os genes que codificam as proteínas VP6 e VP7 dos RVs-D. Estes iniciadores demonstraram boa especificidade e sensibilidade como demonstrado pelos testes estatístico utilizados, uma vez que amplificaram as amostras positivas e negativas por EGPA para RVs-D e não amplificaram amostras de RVs-A.

A presente análise baseou-se essencialmente na EGPA e na RT-PCR para a detecção de RVs-D e ratificou a baixa sensibilidade apresentada pela EGPA para essa infecção viral, já que somente 16,5% das amostras apresentaram perfis de RVs-D, contra 35,3% de positividade na RT-PCR. Em estudos com RVs-A já havia sido demonstrado essa divergência quando usada essas diferentes técnicas (OTTO et al., 2006), já com relação aos RVs-D, essa comparação utilizando-se a EGPA e a RT-PCR nas mesmas amostras até o presente momento não havia sido relatada.

Alguns estudos conduzidos em aves oriundas de alguns países como Bangladesh usando a técnica de EGPA mostraram frequência de RVs-D variando de 13,15% e 19,3% (KARIN et al., 2007; ISLAN et al., 2009); na Índia com 15,2% (SAVITA et al., 2008); na Alemanha com 35,3% (OTTO et al., 2006); e em estudo conduzido em países europeus com 35,5% em frangos e 57,6% em perus (OTTO et al., 2011). Vale ressaltar que todos os estudos citados foram realizados com animais

apresentando sinais clínicos da doença. No Brasil, perfis eletroforéticos distintos de rotavírus foram relatados em amostras de fezes de aves, mas não classificaram suas amostras em grupos (TAMEHIRO et al., 2003).

No entanto, a detecção desses vírus usando somente a técnica de EGPA é problemática por provavelmente subestimar a verdadeira frequência desse grupo de rotavírus, devido a menor sensibilidade dessa metodologia, em relação a outras técnicas moleculares como a RT-PCR. Além disso, os RVs-D não se propagam em cultivos celulares de MA-104 (DEVITT e REYNOLDS, 1993) e, portanto as amostras com baixos títulos virais que não são detectados por EGPA precisam de um método de detecção mais sensível, tal como a RT-PCR.

A frequência de RVs-D em aves encontrada no presente estudo foi 35,3%, baseada em métodos moleculares como a RT-PCR em contraste com a descrita por Otto et al. (2011), que descreveu uma frequência de 65,9% em galinhas e perus. Essa divergência pode ser explicada provavelmente pela diferença na localização geográfica e dos rebanhos, além de diferentes procedências das amostras em relação a ausência de sintomatologia clínica nas aves estudadas. No estudo realizado por Otto et al. (2011) as amostras foram oriundas de aves com sinais clínicos de doença, já neste estudo as amostras procederam de aves sem sinais clínicos aparentes.

Levando-se em consideração a diferença quanto à sintomatologia clínica, faltam mais estudos tanto com aves sintomáticas quanto naquelas ausentes de sintomatologia para indicar se existe faixa etária mais susceptível à infecção. A pesquisa de rotavírus em aves assintomáticas é de suma importância, pois há excreção viral na ausência de manifestações clínicas aparentes, disseminando dessa forma o vírus para animais susceptíveis.

Existem poucos estudos com amostras oriundas de aves sem sinais clínicos de doenças para a detecção de RVs-D por meio da RT-PCR, tornando-se imprescindível a pesquisa e o monitoramento desses agentes virais em aves comerciais usando metodologia mais sensível. Portanto, o presente estudo é pioneiro nesse âmbito, porque oferece dados de frequência, descrição de sequências nucleotídicas e aminoacídicas na Mesorregião Metropolitana de Belém, no Brasil e no mundo no que tange aos RVs-D.

No que diz respeito à idade mais susceptível para infecção por RVs nas aves o presente estudo demonstrou frequência significativa em frangos de 16 a 30 dias ($p = 0,0003$). Outros estudos têm mostrado resultados divergentes, para os RVs-A as aves adultas seriam mais susceptíveis as infecções (56 a 70 dias) se comparado com aves de menor idade (1 a 7 dias) (BARRIOS et al., 1991), já em estudo conduzido por TAMEHIRO et al. (2003) foi demonstrado que o rotavírus foi um importante agente etiológico de distúrbios entéricos, especialmente em frangos de corte com idade inferior a 30 dias. Em relação ao RVs-D, dentre os poucos estudos que verificaram a frequência desse parâmetro mostraram que a idade mais susceptível foi a de aproximadamente 7 a 12 dias (KARIN et al., 2007; ISLAN et al., 2009).

Com relação a migração eletroforética não foi observado no estudo a existência da migração diferenciada do 11º segmento, corroborando com os demais estudos em que não foi descrito esta classificação (OTTO et al., 2006; KARIN et al., 2007; ISLAN et al., 2009; OTTO et al., 2011), contudo em estudo conduzido por Savita et al. (2008) houve a descrição de perfis eletroforéticos de RVs-D classificando-os em longo e curto.

Nas amostras do nosso estudo não foi observado a existência da migração diferenciada do 11º segmento, Mais estudos para identificação dos eletroferotipos de RVs-D poderão responder se existem cepas de RVs-D com migração diferenciada do 11º segmento.

A análise da sequência de aminoácidos do gene *VP6* revelou elevada similaridade entre as amostras do presente estudo e o protótipo do RVs-D (100-99,2%), havendo apenas uma única diferença entre elas no resíduo 12, em que seis amostras da presente análise apresentam uma lisina e o protótipo do RVs-D apresentou uma arginina (a exceção foi a amostra **Rota/D/Chicken/37/PA/BR**). Com relação aos protótipos de aves dos demais grupos, a similaridade das amostras variou de 52,9 - 56,8% (RVs-A), 53,5 - 54% (RVs-F), 42,9 - 43,2% (RVs-G). Tais valores são muito similares aos observados entre as amostras desses grupos em comparação ao RVs-D (42,5 - 57,5%) de acordo com o observado por Trojnar et al. (2010). Ao analisar a sequência de aminoácido do gene *VP6* pode-se observar que não houve significativa diferença com as amostras entre sim e com relação ao

protótipo da Alemanha, concluindo-se que o gene VP6 dos RVs-D é relativamente conservado, assim como o observado com os outros grupos de RVs.

No que tange a análise de aminoácidos para o gene *VP7*, houve maior divergência com o protótipo da Alemanha e com as amostras entre si onde foram observados substituições únicas em algumas amostras. Estudos posteriores poderão revelar se essas modificações aminoacídicas geram alterações conformacionais das proteínas e se acontece a propagação de tais mutações para a progênie viral. Com relação aos protótipos dos demais grupos, a similaridade variou de 50,5-53% (RVs-A), 33,2-34,5% (RVs-B) e 43-46,6% (RVs-C). Tais valores são muito similares aos observados entre as amostras desses grupos em comparação ao grupo D (51,4-65,5%) (TROJNAR et al., 2010). Não foi possível a inclusão dos protótipos dos RVs-F e RVs-G na análise devido a inexistência da descrição de sequências nucleotídicas do gene *VP7* desses grupos de rotavírus em aves. Todas as amostras estudadas quando comparadas com o protótipo tiveram suas peculiaridades aminoacídicas. A existência de somente uma sequência nucleotídica descrita do RVs-D impossibilita uma discussão mais ampla quanto à análise de similaridade e diversidade das cepas circulantes. Portanto, se torna imprescindível o estudo com RVs-D visando diminuir a escassez quanto às informações no que tange à todos os aspectos desse grupo de rotavírus.

Os resultados obtidos ampliam o conhecimento acerca desses agentes virais, tanto em relação a sua frequência, quanto na descrição de sequências nucleotídicas e aminoacídica e é pioneiro no Brasil, e no mundo representando a segunda descrição de sequência de RVs-D.

9. CONCLUSÕES

- O RVs-D foi detectado em granjas de frangos de corte da Mesorregião metropolitana de Belém.
- A detecção foi mais eficiente quando se utilizou a RT-PCR ao invés da EGPA.
- Os iniciadores construídos para VP6 e VP7 demonstraram boa especificidade.
- A frequência de RVs-D encontrada foi de 35,3%.
- Foi verificada a presença de RVs-D em sete dos oito municípios estudados e em 17 das 37 granjas estudadas.
- Foi registrado maior número de casos de infecção por RVs-D na faixa compreendida entre 16 a 30 dias de idade.
- As sequências nucleotídicas de VP6 e VP7 das amostras estudadas foram classificadas como pertencentes ao grupo D de rotavírus.
- O gene VP6 apresentou elevada similaridade com o protótipo e nas amostras entre si havendo apenas uma única diferença entre elas no resíduo 12.
- O gene VP7 mostrou maior variabilidade genética em relação ao protótipo e substituições únicas em algumas amostras quando comparada entre si.

10. PERSPECTIVAS

O uso de ferramentas moleculares com ênfase para a RT-PCR e o sequenciamento de nucleotídeos para os RVs-D é de suma importância haja vista a baixa sensibilidade da EGPA. Desta forma é imprescindível que estudos posteriores sejam conduzidos com o intuito de permitir a descrição de todas as sequências nucleotídicas das amostras positivas obtidas neste estudo, assim como a construção de iniciadores para outros genes do RVs-D e para os grupos F e G, a fim de acumular mais informações sobre esse agente colaborando com o conhecimento acerca da sua diversidade genética.

11. REFÊRENCIAS

- ABE, M., ITO, N., MORIKAWA, S., TAKASU, M., MURASE, T., KAWASHIMA, T., KAWAI, Y., KOHARA, J., SUGIYAMA, M. Molecular epidemiology of rotaviruses among healthy calves in Japan; Isolation of a novel bovine rotavirus bearing new P and G genotypes. **Virus Res**, v.144, p. 250-257, 2009.
- AOKI, S.T., SETTEMBRE, E., TRASK, S.D., GREENBERG, H.B., HARRISON, S.C., DORMITZER, P.H. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. **Science**, v. 324, n.5933, p.1444-1447, 2009.
- ADEPARÁ – Agência de defesa Agropecuária do Estado do Pará. 2006. Granjas cadastradas por município da Mesorregião Metropolitana de Belém. Ofício nº225/2006 ADEPARÁ/DDA.
- AHMED, M.U., KOBAYASHI, N., WAKUDA, M., SANEKATA, T., TANIGUCHI, K., KADER, A., NAIK, T.N., ISHINO, M., ALAM, M.M., KOJIMA, K., MISE, K., SUMI, A. Genetic analysis of group B human rotaviruses detected in Bangladesh in 2000 and 2001. **J. Med. Virol**, v. 72, p.149-55, 2004.
- ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A., RESENDE, J.S., RESENDE, M.A. A new bisegmented double stranded RNA virus in avian feces. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 40, p. 437-440, 1988.
- ALFIERI, A. F., TAMEHIRO, C.Y., ALFIERI, A. A. Vírus entérico RNA fita dupla, segmentado, em aves: Rotavírus, Reovírus e Picobirnavírus. **Semina: Ci. Agrárias**, Londrina, v.21, n.1, p. 101-103, 2000.
- ANONYMOUS. 2008. Síndrome de má absorção (síndrome de pintos ou aves pálido, proventriculitis infecciosas, síndrome runting & nanismo, doença de helicóptero). [http://www.worldpoultry.net / poultry_malabsortion_syndrome /](http://www.worldpoultry.net/poultry_malabsortion_syndrome/) acessada 10/10/2011
- ARAÚJO, I.T., FERREIRA, M.S., FIALHO, A.M., ASSIS, R.M., CRUZ, C.M., ROCHA, M., LEITE, J.P. Rotavirus genotypes P[4]G9, P[6]G9, and P[8]G9 in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, **Brazil. J Clin Microbiol**, v. 39, p.1999-2001, 2001.
- AUNG, T. S., KOBAYASHI, N., NAGASHIMA, S., GHOSH, S., AUNG, M.S., WIN, N. Detection of group B rotavirus in an adult with acute gastroenterite in Yangon. Myanmar. **J. Med. Virol**, v. 81, n. 11, p.1968 -1974, 2009.
- AYRES, M., J.R, AYRES, M.A., D.L., SANTOS, A.S. **BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. 5ed. Belém, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/MCT/CNPq. 2007. p. 364.
- BÁNYAI, K., JIANG, B., BOGDAN, A., HORVÁTH. B., JAKAB, F., MELEG, E., MARTELLA, V., MAGYARI, L., MELEGH, B., SZUCS, G. Prevalence and molecular characterization of human group C rotaviruses in Hungary. **J. Clin. Virol**, v. 37, p. 317-22, 2006.

BARRIOS, H., VIORA, S., FRANCESCHI, M., FLIESS, E. Incidencia de los rotavirus en establecimientos avícolas de producción intensiva. **Rev. Arg. Microbiol**, v. 23, n.1, p. 5-21, 1991.

BERGELAND, M.E., McADARAGH, J.P., STOTZ, I. Enterite por rotavirus em perus. In: **Proceedings of the 26 th Western Poultry Diseases Conference**, 1977, Davis, CA: University of California, 1977. p. 29-120.

BLAST/ NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 10 jan. 2011.

BOOM, R. SOL, C.J., SALIMANS, M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol**, v. 28, p. 495-503,1990.

CRAWFORD, S.E., PATEL, D.G, CHENG, E., BERKOVA, Z., HYSER, J.M., CIARLET, M., FINEGOLD, J., CONNEcR, M.E., ESTES, M.K. Rotavirus viremia and extraintestinal viral infection in the neonatal ratmodel. **J. Virol**, v. 80, p. 4820-4832, 2006.

DAY, J.M., SPACKMAN, E., PANTIN-JACKWOOD, M., 2007. A multiplex RT-PCR test for the differential identification of turkey astrovirus type 1, turkey astrovirus type 2, chicken astrovirus, avian nephritis virus, and avian rotavirus. **Avian. Dis**, v. 51, p. 681-684.

DESSELBERGER, U., MANKTELOW, E., LI, W., CHEUNG, W., ITURRIZA-GÓMARA, M., GRAY, J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **Br. Med. Bull**, v. 90, p. 37-51, 2009.

DESSELBERGER, U. Genome rearrangements of rotaviruses. **Adv. Virus. Res**, v. 46, p. 69-95, 1996.

DEVITT, C. M., REYNOLDS, D. L. Characterization of a group D rotavirus. **Avi. Dis**, v. 37, n. 3, p. 749-755, 1993.

DORMITZER, P. R., GREENBERG, H.B., Calcium chelation induces a conformational change in recombinant herpes simplex virus-1-expressed rotavirus VP7. **Virology**, v.189, n. 2, p. 828-32, 1992.

DORMITZER, P. R., NASON, E.B., PRASAD, B.V., HARRISON, S.C. Structural rearrangements in the membrane penetration protein of a non-enveloped virus. **Nature**, v. 26, p.1053-1058, 2004.

ESTES, M.K., COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. **Microbiol. Rew**, v. 53, n. 4, p. 410-449, 1989.

ESTES, M.K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.L.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAIS, E. **Fields Virology**.4 ed. Lippincott: Williams and Wilkins, 2001. p. 1747–1785.

ESTES, M.K., KAPIKIAN, A.Z. Rotavírus and their replication. In: KNIPE, D. M; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E. **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia : Lippincott Williams e Wilkins, 2007. p.1917.

ELSCHNER, M. HOTZEL, H., REETZ, J., DILLER, R., OTTO, P. Isolation, identification and characterization of group A from a chicken: the inner capsid protein sequence shows only a distant phylogenetic relationship to most other avian group A rotaviruses. **J Vet Med**, v. 52, n. 5, p. 211-213, 2005.

FIORETTI, J.M., FERREIRA, M.S., VICTORIA, M., VIEIRA, C.B., XAVIER, M.DA P., LEITE, J.P., MIAGOSTOVICH, M.P. Genetic diversity of noroviruses in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.106, n. 8, p. 942-7, 2011.

FLAHAULT, A., HANSLIK, T. Epidemiology of viral gastroenteritis in France and Europe. **Bull Acad Natl Med**, v.194, n.8, p.1415-24, 2010.

FUKAI, K., SAITO, T., FUKUDA, O., HAGIWARA, A., INOUE, K., SATO, M. Molecular characterisation of equine group A rotavirus, Nasuno, isolated in Tochigi Prefecture, Japan. **Vet J**, v.172, n. 2, p.369-73. 2006.

GABBAY, Y.B., HOMEM, V.S.F., MUNFORD, V., ALVES, A.S., MASCARENHAS, J.D.P., LINHARES, A.C., RÁCZ, M.L. Detection of rotavirus in dogs with diarrhea in Brazil. *Brazilian j. Microbiol.* v. 34, p. 77-80, 2003.

GABBAY, Y.B., BORGES, A.A., OLIVERA, D.S., LINHARES, A.C., MASCARENHAS, J.D., BARRADI, C.R., SIMOES, C.M., WNAG, Y., GLASS, R.I., JIANG, B. Evidence for zoonotic transmission of group C rotavirus among children in Belem. **Braz. J. Med. Virol**, v. 80, p. 166-74, 2008.

GREEN, K. Y., SARASINI, A., QIAN Y., GERNA, G. Genetic variation in rotavirus serotype 4 subtypes. **Virology**, v. 188, n. 1, p. 362-368, 1992.

GORZIGLIA, M., LARREA, C., LIPRANDI, F., Esparza, J., Biochemical evidence for the oligomeric (possibly trimeric) structure of the major inner capsid polypeptide (45K) of rotaviruses. **J Gen Virol**, v. 66, n. 9, p.1889-1900, 1985.

GOUGH, R. E., W. J. COX., J. DEVOY. Isolation and identification of rotavirus from racing pigeons. **Vet. Rec**, v.130, p.273, 1992.

GUERRERO, C.A., MENDEZ, E., ZARATE, S., ISA, P., LOPEZ, S., ARIAS, C.F. Integrin alpha(v) beta(3) mediates rotavirus cell entry. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, v.97, n. 26, p. 14644- 49, 2000.

GUY, J.S. Infecções por vírus do trato gastrointestinal de aves de capoeira. **Poultry Sci**, v. 77, p.1166-1175, 1998.

HARVALA, H., MCINTYRE, C.L., MCLEISH, N.J., KONDRACKA, J., PALMER, J., MOLYNEAUX, P., GUNSON, R., BENNETT, S., TEMPLETON, K., SIMMONDS, P. High detection frequency and viral loads of human rhinovirus species A to C in fecal samples; diagnostic and clinical implications. **J Med Virol**, v. 84, n. 3, p. 536-42, 2012.

HAYNES, J.S., REYNOLDS, D.L., FAGERLAND, J.A., FIX, A.S. Morphogenesis of enteric lesions induced by group D rotavirus in ringneck pheasant chicks (*Phasianus colchicus*). **Vet. Pathol**, v. 31, p. 74–81, 1994.

HEWISH, M.J., TAKADA, Y, COULSON, B.S. Integrins alpha2beta1 and alpha 4beta1 can mediate SA11 rotavirus attachment and entry into cells. **J. Virol**, v. 74, n. 1, p. 228-36, 2000.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Pesquisa Pecuária Municipal**. Capturado em 13 mar. 2006. Online. Disponível na Internet em: <http://www.sidra.ibge.gov.br>

ISLAM, M.S., ALAM, M.M., AHMED, M.U., SAIFUZZAMAN, A.B.M., KOBAYASHI, N., KAYESH, M.E.H., UDIN, M.S. Molecular epidemiologic study on rotavirus infection in human and birds in association with gastroenteritis. **Bangl. J Vet Med**, v. 7, p. 233-237, 2009.

ITURRIZA-GÓMARA, M., WONG, C., BLOME, S., DESSELBERGER, U., GRAY, J., Molecular characterization of VP6 genes of human rotavirus isolates: correlation of genogroups with subgroups and evidence of independent segregation. **J. Virol**, v. 76, n. 13, p. 6596-6601, 2002.

JINDAL, N., PATNAYAK, D.P., CHANDER, Y., ZIEGLER, A.F., GOYAL, S.M. Detection and molecular characterization of enteric viruses in breeder turkeys. **Avian Pathology**, v.39, n.1, p.53-61, 2010.

JOHNE, R., OTTO, P., ROTH, B., LÖHREN, U., BELNAP, D., REETZ, J., TROJNAR, E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. **Virology**, v. 442, n. 2, p. 384–39, 2011.

KAPAHNKE, R., RAPPOLD, W., DESSELBERGER, U., RIESNER, D. The stiffness of dsRNA: hydrodynamic studies on fluorescence-labelled RNA segments of bovine rotavirus. **Nucleic. Acids. Res.** v.14, p. 3215-3228, 1986.

KAPIKIAN, A.Z., HOSHINO, Y., CHANOCK, R.M. Rotaviruses. **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2001. p. 1747–1785.

KARIM, M.R., RUME, F.I., ALAM, M.M., AHMED, M.U. Molecular Epidemiologic Study on Avian Rotavirus Prevailing in Bangladesh. **Bangl. J. Vet. Med**, v. 5, n. 1-2, p. 43-48, 2007.

KAWAI, K., O'BRIEN, M.A., GOVEIA, M.G., MAST, T.C., KHOURY, A.C. Burden of rotavirus gastroenteritis and distribution of rotavirus strains in Asia: A systematic review. **Vaccine**, 2011.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **J. Mol Evol**, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KRISHNAN, T., SEM, A., CHOUDHURY, J.S., DAS, S. NAIK, T.N., BHATTACHARYA, S.K. Emergence of adult diarrhea rotavirus in Calcutta, India. **Lancet**. v. 353, p. 380-381, 1999.

LAHON, A., CHITAMBAR, S.D. Molecular characterization of VP4, VP6, VP7 and NSP4 genes of group B rotavirus strains from outbreaks of gastroenteritis. **Asian Pac J Trop Med**, v.4, n. 11, p. 846-9, 2011.

LEE, S.G., YOUN, S.H., OH, M.H., RHEE, O.J., OH, S., PAIK, S.Y. Molecular characterization of two strains of porcine group C rotavirus. **J Microbiol**, v. 49, n. 6, p. 1058-62, 2011.

LEGROTTAGLIE, R., RIZZI, V., AGRIMI, P. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis**, v. 20, n. 3, p. 205-210, 1997.

LOJKIC, I., BIDIN, M., BIDIN, Z., MIKEC, M. Viral Agents Associated With Poultry Enteritis In Croatian Commercial Turkey Flocks. **Acta Vet**, v. 79, p. 91-98, 2009.

LOPEZ, S., ARIAS, C.F. Multistep entry of rotavirus into cells: a Versaillesque dance. **Trends. Microbiol**, v. 12, n. 6, p. 271-8, 2004.

LUDGREN, O., SVENSSON, L. Pathogenesis of rotavirus diarrhea. **Microbes. Infect**, v. 3, p.1145-1156, 2001.

MAASS, D.R., ATKINSON., P.H. Rotavirus proteins VP7, NS28, and VP4 form oligomeric structures. **J Virol**, v. 64, n. 6, p. 2632-2641, 1990.

MASCARENHAS, J.D., GUSMAO, R.H., GABBAY, Y.B., MONTEIRO, T.A., GOMES, J. B., LINHARES, A.C. Concomitant rotavirus serotypes 1 and 4 infections in a diarrhoeic child from Belem, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 38, p. 249–252, 1996.

MASCARENHAS, J.D.P., LINHARES, A.C., BAYMA, A.P., LIMA, J.C., SOUSA, M.S., ARAÚJO I.T., HEINEMANN, M.B., GUSMÃO, R.H., GABBAY, Y.B., LEITE, J.P. Molecular Analysis of VP4, VP7, and NSP4 Genes of P[6]G2 Rotavirus Genotype Strains Recovered From Neonates Admitted to Hospital in Belém, Brazil. **J. Med. Virol**, v. 78, n. 2, p. 281–289, 2006.

MATTION, N., COHEN, J., ESTES, M. The rotavirus proteins. In Kapikian AZ, ed. **Viral Infectious of Gastrointestinal Tract**. New York: Marcel Dekker, 1994, p. 169-249.

McCLAIN, B., SETTEMBRE, E., TEMPLE, B.R.S., BELLAMY, A.R., HARRISON, S.C. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab. **J. Mol. Biol.**, v. 397, n. 2, p. 587–599, 2010.

McNULTY, M.S. ALLAN, G. M., STUART, J.C. Rotavirus infection in avian species. **Vet. Rec.**, v. 103, n. 14, p. 319-320, 1978.

MUNFORD, V. **Diversidade sorológica e molecular de rotavírus identificados em humanos em São Paulo, Brasil.** 2007. 141f. Tese (Doutorado em Ciências-Microbiologia). Universidade de São Paulo. São Paulo.

NISHIKAWA, K., HOSHINO, Y., TANIGUCHI, K., GREEN, K.Y, GREENBERG, H.B., KAPIKIAN, A.Z., et al. Rotavirus VP7 neutralization epitopes of serotype 3 strains. **Virology**, v.171, n. 2, p. 503-15, 1989.

OTTO, P., LIEBLER-TENORIO, E.M., ELSCHNER, M., REETZ, J., LOHREN, U., DILLE, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). **Avian Dis**, v. 50, p. 411– 418. 2006.

OTTO, P.H., AHMED, M.U., HOTZEL, H., MACHNOWSKA, P., REETZ, J, ROTH, B., TROJNAR, E., JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. **Vet Microbiol**, 2011.

PAGE, R.K., FLETCHER, O.J., ROWLAND, G.N., GAUDRY, D., VILLEGAS, P. Malabsorption syndrome in broiler chickens. **Avian Dis**, v. 26, p.618–624, 1982.

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. **Avian Dis**, n. 52, p.235-44, 2007.

PEREIRA, H.G. AZEREDO, R.S., LEITE, J.P., BARTH, O.M., SUTMOLLER, F., DE FARIAS V., VIDAL, M.N. Comparison of Polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE), Immuno-Electron Microscopy (IEM) and Enzyme Immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 78, n. 4, p. 483-490, 1983.

PESAVENTO, J.B., CRAWFORD, S.E, ESTES, M. K., PRASAD, B.V. Rotavirus proteins: structure and assembly. **Curr. Top. Microbiol. Immunol**, v. 309, p.189-219, 2006.

RÁCZ, M.L. KROEFF, S.S., MUNFORD, V., CARUZO, T.R., DURIGON, E.L., HAYASHI, Y., GOUVEA, V., PALOMBO, E.A. Molecular characterization of porcine rotaviruses from the southern region of Brazil: characterization of an atypical genotype G[9] strain. **J. Clin. Microbiol**, v. 38, n. 6, p. 2443-2446, 2000.

REBEL, J.M.J., BALK, F.R.M., POST, J., VAN HEMERT, S., ZEKARIAS, B., STOCKHOFEN. Síndrome de má absorção em frangos de corte. **Poultry Sci. mundo**, J, v.62, p.17-29, 2006.

REIDY, N., LENNON, G., FANNING, S., POWER, E., OSHEA, H. Molecular characterization and analysis of bovine rotavirus strains circulating in Ireland 2002-2004. **Vet Microbiol.** v. 31, p. 242-247, 2006.

REYNOLDS, D.L., SAIF, Y.M., THEIL, K.W. A survey of enteric viruses of turkey poults. **Avian Dis**, v.31, p.89-98, 1987.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York: Cold Spring, 1989. p. 345 .

SANTOS, N.S.O., SOARES, C.C. Viroses Entéricas. In: SANTOS, N.S.O. et al. **Introdução à Virologia Humana**. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.145-160.

SAVITA, A.L., KUSUMAKAR., MINAKSHI, G., PRASAD. Detection and characterization of group A and D avian rotaviruses in India. **Indian J. Biotech.** v. 7, p. 554-556, 2008.

SILVA, L.C., SANCHES, A.A., GREGORI, F., BRANDÃO, PE., ALFIERI A.A., HEADLEY, S.A., JEREZ, J.A. First description of group A rotavirus from fecal samples of ostriches (*Struthio camelus*). **Res Vet Sci**, 2011.

SCHUMANN, T., HOTZEI, H., OTTO, P., JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. **Virology**, v. 386, p. 334–343, 2009.

SPACKMAN, E., DAY, J.M., PANTIN-JACKWOOD, M.J. Astrovirus, reovirus, and rotavirus concomitant infection causes decreased weight gain in broad-breasted white poults. **Avian Dis**, v.54, p.16-21, 2010.

SUZUKI, T., KUGA, K., MIYAZAKI, A., TSUNEMITSU, H. Genetic divergence and classification of non-structural protein 1 among porcine rotaviruses of species B. **J Gen Virol**, v. 92, p. 2922-9, 2011.

TAMEHIRO, C.Y. ALFIERI, A.F., MEDICI, C., ALFIERI, A.A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 4, p. 344-348, 2003.

TAYEB, H.T., BALKHY, H.H., ALJOHANY, S.M, ELBANYAN, E., ALALOLA, S., ALSHAALAN, M. Increased prevalence of rotavirus among children associated gastroenteritis in Riyadh Saudi Arabia. **Virol J**, v.18, n.8, p. 548. 2011.

TAKASE, K., NONAKA, F., SAKAGUCHI, M., YAMADA, S. Cytopathic avian rotavirus isolated from duck faeces in chicken kidney cell cultures. **Avian Pathol**, v.15, p. 719–730, 1986.

TROJNAR, E., OTTO, P., ROTH, B., REETZ, J., JOHNE, E. The genome segments of a group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific proteins. **Journal of Virology**, v. 84, n. 19, p. 10254–10265, 2010.

URSU, K., PAPP, H., KISFALI, P., RIGÓ, D., MELEGH, B., MARTELLA, V., BÁNYAI, K. Monitoring of Group A Rotaviruses in Wild-Living Birds in Hungary. **Avian Diseases**, v.55, n.1, p.123-127, 2011.

VELAZQUEZ, R. J., LEÓN, S.N., FLORES, V. H., VILLAFAÑA, R.S., CANIZALEZ, R. A. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the Coastal Environment of Northwest Mexico is associated with recurrent diarrheal cases from 2004 to 2010. **Appl Environ Microbiol**, 2012.

VENKATARAMAN, S., ALLISON, D.P., QI, H., MORRELL-FAVEY, J.L., KALLEWAARD, N.L., CROWE, J.E., DOKTYCZ, M. J. Automated image analysis of atomic force microscopy images of rotavirus particles. **Ultramicroscopy**, v.106, p.829-837, 2006.

VILLARREAL, L.Y.B., ULIANA, G., VALENZUELA, C., CHACÓN, J.L.V., SAIDENBERG, A.B. S., SANCHES, A.A., BRANDÃO, P.E, JEREZ, J.A., FERREIRA, A. J.P. Rotavirus detection and isolation from chickens with or without symptoms. **Bras. J. Poult. Sci**, v. 8, n. 3, p. 187-191, 2006.

VILLARREAL, L.Y.B. **Detecção de um coronavírus entérico aviário em aves de corte, poedeiras comerciais e matrizes: distribuição, diversidade molecular e diagnóstico diferencial com outros vírus entéricos**. 2006. 96f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

YASON, C.V., SCHAT, K.A. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: Clinical signs and virology. **Am. J. Vet. Res**, v. 48, n. 6, p. 977-983, 1987.

YEGANI, M., KORVE, D.R. Factors Affecting Intestinal Health in Poultry. **Poultry Science**, v.87, p.2052–2063, 2008.

ZENG, C.Q.Y., LABBÉ, M., COHEN, J., PRASAD, B.V.V., CHEN, D., RAMIG, R.F., ESTES, M.K. Characterization of Rotavirus VP2 Particles. **Virology**, v.201, p. 55-65. 1994.

APÊNDICE I



Parecer nº 0011/2007/CEPAN/IEC/SVS/MS

Protocolo CEPAN - nº 0004/2007

Ananindeua/PA, 28 de maio de 2007.

Projeto: "Pesquisa de rotavírus em aves criadas em granjas na mesoregião metropolitana de Belém".

Pesquisador Responsável: JOANA D'ARC PEREIRA MASCARENHAS

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, em sua reunião realizada no dia 19/04/2007, cientificamos que o projeto acima foi considerado aprovado.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este CEPAN, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,

PAULO HENRIQUE GOMES DE CASTRO
Coordenador do CEPAN/IEC

APÊNDICE II

TERMO DE ANUÊNCIA (GRANJA)

Eu, _____, responsável _____ pela _____ granja: _____, convidado a permitir que seja realizado o estudo: "**Pesquisa de Vírus Entéricos em Aves Criadas em Granjas na Mesoregião Metropolitana de Belém-PA**", no estabelecimento avícola supracitado, fui informado que:

- O estudo tem o objetivo de avaliar a ocorrência de vírus entéricos em granjas avícolas da região Mesoregião Metropolitana de Belém;
- Para cada granja, será preenchida uma ficha epidemiológica com dados de manejo de produção do estabelecimento;
- Serão coletadas amostras fecais depositadas sobre as camas em nove pontos distintos de cada aviário amostrado, por profissional capacitado;
- É pouco provável que ocorra óbito durante o procedimento de coleta, pois essas aves passam por estresses superiores durante a captura e transporte para o abatedouro, mas caso ocorra morte da ave durante o procedimento de coleta, a carcaça receberá o destino designado pelo médico veterinário responsável pela granja.
- Estas amostras serão acondicionadas sob refrigeração e encaminhadas ao Instituto Evandro Chagas (IEC) em Ananindeua - PA, onde serão realizados os exames para isolamento de Rotavírus. As sobras das amostras serão acondicionadas em embalagens isotérmicas e enviadas para o incinerador do IEC, onde serão descartadas. As cepas isoladas serão armazenadas em freezer -70°C e ficarão sob responsabilidade do IEC;
- O projeto beneficiará as granjas participantes, uma vez que os resultados dos exames serão disponibilizados para o responsável pelo estabelecimento avícola, permitindo a adoção de medidas preventivas;
- Os dados do estabelecimento serão mantidos em sigilo e os resultados somente serão utilizados com finalidade de pesquisa;
- A qualquer momento, o responsável pela granja terá liberdade de perguntar ou questionar os pesquisadores sobre a conduta que estiver sendo realizada;
- Caso qualquer responsável pela granja queira abandonar o estudo, nenhuma penalidade lhe será aplicada, pois sua participação é voluntária.

Dra. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

Endereço: Instituto Evandro Chagas BR 316 S/N

Telefone: 32142016

Ciente das informações acima, aceito por minha livre e espontânea vontade, incluir minha granja nesta pesquisa

_____, PA _____ de _____ de 20__

Assinatura do responsável pela granja

APÊNDICE III

	10	20	30	40	50	60	70
RVD/Av/05V0049	M	T	R	C	S	L	H
RD109-Tauá	?	?	?	?	?	?	?
RD91- Sta Isabel	V	V	L
RD105-Castahal	V	A	L	.	V	.	K
RD27- Ananindeua	V	A	L	.	V	.	K
RD69- Sta Bárbara	V	A	L	.	V	.	K
RD43- Benevides	V	A	L	.	V	.	K
RD37- Inhaçapi	F

	80	90	100	110	120	130	140
RVD/Av/05V0049	K	Y	N	T	I	C	M
RD109-Tauá
RD91- Sta Isabel	S
RD105-Castahal
RD27- Ananindeua
RD69- Sta Bárbara
RD43- Benevides
RD37- Inhaçapi

	150	160	170	180	190	200	210
RVD/Av/05V0049	Y	S	N	L	D	Q	V
RD109-Tauá	I
RD91- Sta Isabel	E	.	D
RD105-Castahal	E	.	D
RD27- Ananindeua	E	.	D
RD69- Sta Bárbara	E	.	D
RD43- Benevides	E	.	D
RD37- Inhaçapi	E	.	D

	220	230	240	250	260	270	280
RVD/Av/05V0049	A	N	D	K	F	E	I
RD109-Tauá	V
RD91- Sta Isabel	V	.	V	L	.	.	.
RD105-Castahal	V
RD27- Ananindeua	V
RD69- Sta Bárbara	V
RD43- Benevides	V
RD37- Inhaçapi	V

ANEXO I

Letra	Sigla	Nomes dos aminoácidos	Caráter
A	Ala	Alanina	Não Polar
C	Cis	Cisteína	Não Polar
D	Asp	ácido aspártico	Ácido
E	Glu	ácido glutâmico	Ácido
F	Fen	Fenilalanina	Não Polar
G	Gli	Glicina	Não Polar
H	His	Histidina	Básico
I	Ile	Isoleucina	Não Polar
K	Lis	Lisina	Básico
L	Leu	Leucina	Não Polar
M	Met	Metionina	Não Polar
N	Asn	Asparagina	Polar
P	Pro	Prolina	Não Polar
Q	Gln	Glutamine	Polar
R	Arg	Arginina	Básico
S	Ser	Serina	Polar
T	Tre	Treonina	Polar
V	Val	Valina	Não Polar
W	Trp	Triptofano	Não Polar
Y	Tir	Tirosina	Polar