



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

**RENÉ RIBEIRO DA SILVA**

**DETECÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E ANÁLISE MOLECULAR DE ROTAVÍRUS,  
PICOBIRNAVÍRUS E REOVÍRUS EM AVES DE CORTE CRIADAS EM GRANJAS  
NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE  
BELÉM, PARÁ, BRASIL.**

**BELÉM**

**2012**

**RENÉ RIBEIRO DA SILVA**

**DETECÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E ANÁLISE MOLECULAR DE ROTAVÍRUS,  
PICOBIRNAVÍRUS E REOVÍRUS EM AVES DE CORTE CRIADAS EM GRANJAS  
NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE  
BELÉM, PARÁ, BRASIL.**

Tese de Doutorado apresentada à banca examinadora do programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, da Universidade Federal do Pará.

Orientador(a): Dr<sup>a</sup>. Joana D 'Arc Pereira Mascarenhas

Co-orientador: Dr. Artur Luiz da Costa da Silva

**BELÉM**

**2012**

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

---

Silva, René Ribeiro da.

Detecção, epidemiologia e análise molecular de rotavírus, picobirnavírus e reovírus em aves de corte criadas em granjas na mesorregião metropolitana de Belém, Pará, Brasil / René Ribeiro da Silva; orientadora, Joana D’Arc Pereira Mascarenhas. – 2012

Tese (Doutorado) – 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



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

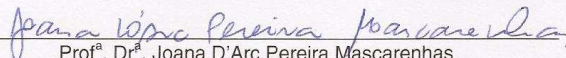
RENÉ RIBEIRO DA SILVA

**DETECÇÃO, EPIDEMIOLOGIA E ANÁLISE MOLECULAR DE ROTAVÍRUS, PICOBIRNAVÍRUS E REOVÍRUS EM AVES DE CORTE CRIADAS EM GRANJAS NA MESORREGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM, PARÁ, BRASIL.**

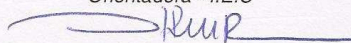
Tese de Doutorado apresentada para a obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais.

Aprovado em: 29/08/2012

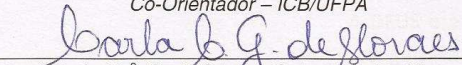
**Banca Examinadora**



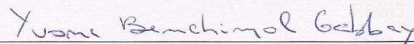
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas  
Orientadora - I.E.C



Prof. Dr. Artur Luiz da Costa da Silva  
Co-Orientador - ICB/UFPA



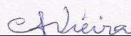
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carla Cristina Guimarães De Moraes  
Membro - UFPA



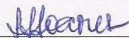
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Yvone Benchimol Gabbay  
Membro - I.E.C



Prof. Dr. Rodrigo Vellasco Duarte Silvestre  
Membro - I.E.C



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Conceição de Maria Almeida Vieira  
Membro - ISPA/UFRA



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luana da Silva Soares  
Suplente - I.E.C



A DEUS e a espiritualidade amiga por me guiarem ao longo desta jornada que é a vida. Aos meus pais, DIONE e RÉGIS, extensão do amor divino na terra. Aos meus irmãos, DANNA e RÉGIS Jr, pelo amor incondicional ao longo destes anos. A minha Tia LIGIA, por tanto me amar. A minha maior "VITÓRIA", ÂNGELA VITÓRIA, por me permitir o amor paterno. A minha esposa e companheira, IONE, pelo amor, compreensão e exemplo de dedicação ao trabalho. Aos meus amigos e companheiros de caminhada, por também terem feito parte desta história.

## **AGRADECIMENTOS**

- A Deus, pelos momentos felizes e difíceis de minha jornada, pois me fizeram evoluir enquanto ser humano e, pela maior graduação concedida, a “VIDA”.
- A minha família, base da minha formação pessoal e moral, em especial, ao incentivo diário de minha mãezinha nos momentos de abatimento.
- A minha orientadora, Dra. Joana Mascarenhas, pela oportunidade, apoio, atenção e conhecimentos repassados. E também por nunca deixar de perguntar por mim.
- Ao meu co-orientador, Dr. Artur Silva, minha gratidão pela confiança depositada e presteza na resolução de problemas quando solicitado.
- A Universidade Federal do Pará e ao Núcleo de Medicina Tropical por oportunizar outra etapa de minha formação profissional.
- A FAPESPA pelo auxílio concedido no desenvolvimento deste projeto.
- Ao Instituto Evandro Chagas que forneceu todo o suporte técnico e científico para execução desta pesquisa.
- Aos membros da banca pelo aceite e contribuições valiosas.
- A todos da Seção de Virologia pelo apoio, suporte técnico e conforto nos momentos de insegurança. E também pelos momentos de descontração, e foram muitos.
- A equipe do Laboratório de Rotavírus e Astrovírus por toda ajuda e carinho.
- As amigas Delana Bezerra, Jane Kaiano (sem estresse) e Cristina Manno, pelo companheirismo, vocês foram imprescindíveis para o pleno andamento e conclusão desta pesquisa.
- A Luana Soares, Euzeni Menezes, Sylvia Guerra, Alessilva, Ian Carlos, Jones, Darleise Oliveira, Fernanda Sagica, Rodrigo Vellasco e Jackson Lima pela imensa colaboração e conhecimento disponibilizados.
- Aos meus amigos Darivaldo e Régis, pela amizade e conhecimento ofertados, principalmente nos momentos de lazer.
- A todos os envolvidos nas colheitas das amostras (empresas, proprietários e funcionários), pois sem a permissão e ajuda destes nesta etapa do projeto, a concretização dos trabalhos não seria possível.
- Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, pela liberação concedida.

- A chefia do Laboratório Nacional Agropecuário, por ter abraçado esta causa.
- Aos meus companheiros de Laboratório de Diagnóstico Animal, em especial aos amigos Sílvio Chaves, Cícero Costa, Luciana Yumi, Ingrid Toda e Ursulla Tavares pelo apoio e compreensão na minha longa ausência.
- Aos meus professores e amigos que tive a oportunidade de conviver ao longo de minha vida. Também tem um pouco de vocês nesta conquista.
- A todos aqueles que participaram de alguma forma no desenvolvimento desta pesquisa.

“... A dúvida é o preço da pureza e é inútil ter certeza...”

*(Humberto Gessinger)*

## RESUMO

Este estudo objetivou investigar a ocorrência de rotavírus aviário (RVA), picobirnavírus (PBV) e reovírus aviário (ARV) em aves de corte criadas em granjas situadas na Mesorregião Metropolitana de Belém, Pará, no período compreendido entre 2008 a 2011. Para tal, foram colhidos 85 *pools* de amostras fecais provenientes de 37 granjas pertencentes a oito municípios. O RNA viral foi extraído a partir das suspensões fecais e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) seguido da RT-PCR. Foi selecionada pelo menos uma amostra de cada município positivo para o sequenciamento de nucleotídeos dos genes NSP4 (rotavírus), RdRp (picobirnavírus) e S2 (reovírus), sendo que no caso dos picobirnavírus as amostras foram clonadas antes do sequenciamento. A EGPA demonstrou positividade em 0/85 (0%) amostras para RVA do grupo A, 13/85 (15,3%) amostras para PBV e 01/85 (1,2%) amostras para ARV. No caso da RT-PCR foi verificado positividade em 35/85 (41,2%), 42/85 (49,4%) e 28/85 (32,9%) das amostras para RVA, PBV e ARV, respectivamente. Dos oito municípios estudados, sete apresentaram amostras positivas para PBV e seis apresentaram amostras positivas para RVA e ARV. Das 37 granjas estudadas foi observada a presença dessas infecções virais em 19 (51,4%) para RVA e ARV e 21 (56,8%) para PBV. As sequências do gene NSP4 apresentaram entre 86,3 e 90,5% de similaridade ao nível de nucleotídeo (nt) com protótipos de frangos e 93,5 e 100% de similaridade ao nível de nt quando comparadas entre si. As sequências do gene RdRp apresentaram uma grande heterogeneidade genética com variantes gênicas apresentando entre 56,1 e 100% de similaridade ao nível de nt com protótipos pertencentes a várias espécies e fontes de contaminação e entre 50,3 e 100% de similaridade ao nível nt quando comparadas entre si. Na análise das sequências do gene S2 de ARV foi observado entre 90,9 e 94,4% de similaridade ao nível de nt com protótipos de frangos e 90,1 e 100% de similaridade ao nível de nt quando comparadas entre si. Os RVA, PBV e ARV foram detectados em granjas de frangos de corte da Mesorregião Metropolitana de Belém, sendo a detecção por RT-PCR a mais eficiente ao detectar pelo menos um dos vírus nos oito municípios pesquisados. Excetuando-se o PBV, que apresentou relacionamento heterogêneo com os protótipos utilizados, o RVA e ARV deste estudo relacionaram-se especificamente com amostras obtidas em aves. Este é o primeiro estudo envolvendo o sequenciamento gênico do RVA, PBV e ARV em frangos de corte na região norte do Brasil.

Palavras-chave: Rotavírus. Picobirnavírus. Reovírus. Frangos de corte. Análise molecular.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the occurrence of avian rotavirus (AvRV), picobirnavirus (PBV) and avian reovirus (ARV) in chickens raised on farms located in the Metropolitan mesoregion of Belém, Pará state, in the period of 2008 to 2011. For this purpose, 85 *pools* of fecal samples were collected from 37 farms belonging to eight counties. Viral RNA was extracted from fecal suspensions and subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) followed by RT-PCR. At least one sample was selected of each municipality with positive result for nucleotide sequencing of the genes NSP4 (AvRV), RdRp (PBV) and S2 (ARV), and in the case of the PBV samples were cloned before sequencing. PAGE showed positive in 0/85 (0%) samples for AvRV group A, 13/85 (15.3%) samples for PBV and 01/85 (1.2%) samples for ARV. In the case of RT-PCR positive results was observed in 35/85 (41.2%), 42/85 (49.4%) and 28/85 (32.9%) of the samples for AvRV, ARV and PBV, respectively. Of the eight counties studied, seven showed positivity to PBV, and six for AvRV and ARV. Of the 37 farms studied the presence of these viral infections was observed in 19 (51.4%) to AvRV and ARV and 21 (56.8%) to PBV. NSP4 gene sequences had a similarity between 86.3 and 90.5% at the nucleotide level (nt) with prototypes from chicken and 93.5 and 100% similarity at the nt level when compared among them. RdRp sequences showed a high genetic heterogeneity with gene variants resulting between 56.1 and 100% similarity at the nt level with prototypes belonging to different species and sources of contamination and between 50.3 and 100% similarity at nt level when compared among them. S2 gene sequences analysis showed between 90.9 and 94.4% similarity at the nt level with chicken prototypes and 90.1 and 100% similarity at the nt level when compared each other. AvRV, ARV and PBV were detected in broiler farms of the Metropolitan mesoregion of Belém, being the detection by RT-PCR more efficient to detect at least one type of virus in the eight counties surveyed. Except for the PBV, which showed heterogeneous relationship with the prototypes used, the AvRV and ARV of this study related specifically to the samples obtained in birds. This is the first study involving the genomic sequencing of the AvRV, ARV and PBV in broilers in northern Brazil.

Keywords: Rotavirus. Picobirnavirus. Reovirus. Broilers. Molecular analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Microscopia Eletrônica do RVA.	23
<b>Figura 2</b>	Relação dos segmentos genômicos dos RV com as proteínas codificadas.	23
<b>Figura 3</b>	Esquema da partícula de RV com a localização das proteínas.	24
<b>Figura 4</b>	Demonstração esquemática do padrão de migração eletroforética dos segmentos das amostras de RV dos grupos A a G.	27
<b>Figura 5</b>	Padrões genômicos observados em RVA.	28
<b>Figura 6</b>	Micrografia eletrônica do RV, PBV e Reovírus.	35
<b>Figura 7</b>	Picobirnavírus demonstrando seus dois segmentos genômicos e superfície em 3D.	36
<b>Figura 8</b>	Padrão eletroforético longo e curto do PBV obtido em amostra fecal de criança.	37
<b>Figura 9</b>	Organização genômica dos segmentos 1 e 2 do PBV humano.	38
<b>Figura 10</b>	Representação esquemática do ARV.	42
<b>Figura 11</b>	Padrão eletroforético do ARV em comparação ao Reovírus de mamífero.	45
<b>Figura 12</b>	Análise filogenética comparando sequência da NSP4 obtida na amostra Ch-2G3 com as correspondentes em galinhas (iniciadas em Ch), perus (iniciadas em Tu), pombo (PO-13) e RV símio (SA11).	51
<b>Figura 13</b>	Árvore filogenética mostrando história evolucionária de um fragmento de 201 pb do PBV em peru (turkey NC contig 101) usado em uma análise metagenômica.	52



<b>Figura 14</b>	Municípios em que foram realizadas as colheitas das amostras.	58
<b>Figura 15</b>	Aviário em que foi realizado uma das colheitas.	61
<b>Figura 16</b>	Representação esquemática da colheita realizada.	61
<b>Figura 17</b>	Representação esquemática do preparo das suspensões fecais.	63
<b>Figura 18</b>	Representação esquemática da extração do genoma viral.	63
<b>Figura 19</b>	Representação esquemática da EGPA.	64
<b>Figura 20</b>	EGPA para PBV demonstrando as amostras positivas.	72
<b>Figura 21</b>	Amostras positivas para o gene que codifica a proteína NSP4 do RVA com amplificação de um fragmento de 642 pb.	73
<b>Figura 22</b>	Amostras positivas para o gene RdRp do PBV genogrupo I com amplificação de um fragmento de 201 pb.	73
<b>Figura 23</b>	Amostras positivas para o gene S2 de Reovírus com amplificação de um fragmento de 625 pb.	74
<b>Figura 24</b>	Árvore filogenética construída usando as sequências do gene NSP4 do RVA amplificados de 20 amostras de <i>pool</i> /fecal de aves.	80
<b>Figura 25</b>	Diferenças observadas no alinhamento das sequências deduzidas de aa da proteína NSP4 para os RVA detectados neste estudo em comparação com o protótipo 02V0002G3.	82
<b>Figura 26</b>	Árvore filogenética das sequências nucleotídicas dos fragmentos clonados do gene RdRp do PBV.	85
<b>Figura 27</b>	Alinhamento das variantes genômicas detectadas neste estudo em comparação com o protótipo Bovine/RUBV-P.	87

<b>Figura 28</b>	Árvore filogenética construída usando as sequências do gene S2 do ARV amplificados de 15 amostras de <i>pool</i> fecal de aves.	88
<b>Figua 29</b>	Alinhamento das sequencias deduzidas de aa detectadas neste estudo em comparação com o protótipo OS161.	89
<b>Quadro 1</b>	Localização e função das proteínas dos RV.	25
<b>Quadro 2</b>	Relação dos segmentos genômicos do ARV e proteínas codificadas.	43
<b>Quadro 3</b>	Iniciadores utilizados na RT-PCR para amplificação de genes do RVA, PBV e ARV.	65
<b>Quadro 4</b>	Condições utilizadas na PCR para amplificação de genes do RVA, PBV e ARV.	66
<b>Quadro 5</b>	Rotavírus utilizados para comparação neste estudo.	69
<b>Quadro 6</b>	Picobirnavírus utilizados para comparação neste estudo.	70
<b>Quadro 7</b>	Reovírus utilizados para comparação neste estudo.	71
<b>Quadro 8</b>	Esquema de utilização dos clones na árvore filogenética de acordo com a identidade nucleotídica que apresentaram.	83

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Frequência dos RVA em frangos e perus com base na EGPA e RT-PCR.	32
<b>Tabela 2</b>	Positividade para PBV em aves nas Américas.	39
<b>Tabela 3</b>	Ocorrência dos ARV em frangos e perus.	47
<b>Tabela 4</b>	Relação das granjas e galpões colhidos por municípios.	60
<b>Tabela 5</b>	Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte de oito municípios da Mesorregião Metropolitana de Belém.	75
<b>Tabela 6</b>	Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte de diferentes idades.	76
<b>Tabela 7</b>	Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte submetidos a diferentes densidades populacionais.	77
<b>Tabela 8</b>	Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte das diferentes integradoras.	78
<b>Tabela 9</b>	Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte nas diferentes estações.	78
<b>Tabela 10</b>	Detecção das viroses entéricas por RT-PCR sozinhas ou em combinação.	79
<b>Tabela 11</b>	Valores de similaridade aos níveis de nt e aa observados entre variantes identificadas neste estudo e sequências protótipo, considerando agrupamentos que apresentaram valores de <i>bootstrap</i> iguais ou superiores a 99%	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – aminoácido  
ARV – Reovírus aviário  
cDNA - DNA complementar  
*cut off* – ponto de corte  
EGPA - eletroforese em gel de poliacrilamida  
IEC – Instituto Evandro Chagas  
kDa- kilo Dalton  
mA - milli-Âmperes  
mg – miligrama  
mL - mililitro  
ng – nanogramas  
nm – nanômetros  
NSP – Proteína não estrutural  
nt - nucleotídeo  
ORF - fase aberta de leitura  
pb - pares de bases  
PBV - Picobirnavirus  
RE - retículo endoplasmático  
RNAfd - ácido ribonucléico de fita dupla  
RNAm - RNA mensageiro  
RPM - rotações por minuto  
RT-PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida por transcrição Reversa  
RV – Rotavírus  
RV-A – Rotavírus do grupo A  
RVA – Rotavírus aviário  
RVA-A – Rotavírus aviário do grupo A  
SG - Subgrupo  
TA - temperatura ambiente  
TBE - tampão tris-borato-EDTA  
VP – Proteína estrutural

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>22</b>
2.1	ROTAVÍRUS	22
2.1.1	Considerações iniciais	22
2.1.2	Organização genômica dos rotavírus	22
2.1.3	Classificação em grupos	26
2.1.4	Perfil eletroforético	26
2.1.5	A proteína NSP4	28
2.1.6	Epidemiologia	30
2.1.7	Patogenia e sintomatologia	33
2.2	PICOBIRNAVÍRUS (PBV)	34
2.2.1	Considerações iniciais	34
2.2.2	Organização genômica	35
2.2.3	Classificação	36
2.2.4	Perfil eletroforético	37
2.2.5	Segmento genômico 2 do PBV	38
2.2.6	Epidemiologia	39
2.2.7	Patogenia e sintomatologia	40
2.3	REOVÍRUS AVIÁRIO (ARV)	41
2.3.1	Considerações iniciais	41
2.3.2	Organização genômica	41
2.3.3	Classificação	44
2.3.4	Perfil eletroforético	45
2.3.5	Proteína $\sigma$ A do ARV	45

2.3.6	<b>Epidemiologia</b>	46
2.3.7	<b>Patogenia e sintomatologia</b>	47
2.4	<b>PRINCIPAIS FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE VIROSES ENTÉRICAS EM AVES</b>	48
2.4.1	<b>Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)</b>	48
2.4.2	<b>Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR)</b>	49
2.4.3	<b>Sequenciamento genômico</b>	51
3.	<b>JUSTIFICATIVA</b>	54
4	<b>OBJETIVOS</b>	56
4.1	GERAL	56
4.2	ESPECÍFICOS	56
5	<b>METODOLOGIA</b>	57
5.1	ASPECTOS ÉTICOS E DE BIOSSEGURANÇA	57
5.2	ÁREA DE ESTUDO	57
5.3	COLHEITA DAS AMOSTRAS	59
5.4	SUSPENSÕES FECALIS	62
5.5	EXTRAÇÃO DO GENOMA VIRAL	63
5.6	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR	64
5.6.1	<b>EGPA</b>	64
5.6.2	<b>RT-PCR</b>	65
5.6.3	<b>Eletroforese em gel de agarose</b>	66
5.6.4	<b>Purificação e quantificação</b>	66
5.6.5	<b>Clonagem e Sequenciamento</b>	67
5.6.6	<b>Análise das sequências</b>	68

5.6.7	<b>Análise estatística</b>	71
6	<b>RESULTADOS</b>	72
6.1	EGPA	72
6.2	RT-PCR	73
6.3	ANÁLISE FILOGENÉTICA	79
6.3.1	<b>Rotavírus</b>	79
6.3.2	<b>Picobirnavírus</b>	82
6.3.3	<b>Reovírus</b>	88
7	<b>DISCUSSÃO</b>	90
8	<b>CONCLUSÕES</b>	106
9	<b>PERSPECTIVAS</b>	108
10	<b>REFERÊNCIAS</b>	109
ANEXO A	ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL	123
APÊNDICE A	TERMO DE ANUÊNCIA (GRANJA)	124
APÊNDICE B	ARTIGO SUBMETIDO	125



## 1 INTRODUÇÃO

O agronegócio cresceu em 2011, o dobro da economia brasileira. Preços altos e volumes recordes de produção levaram o Produto Interno Bruto (PIB) do setor a R\$ 942 bilhões. Com isso, a participação do agronegócio na economia aumentou de 21,78% em 2010, para 22,74% em 2011 (Folha Web, 2012). Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBABEF) (2011), a avicultura brasileira representava um PIB de R\$ 36 bilhões, correspondendo a 1,5% do PIB nacional, gerando 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos.

A avicultura brasileira nos últimos anos vem se modernizando por conta de investimentos em processos tecnológicos, o que tem possibilitado maior expansão deste setor da economia nacional em relação ao mercado mundial. Diante desta perspectiva, de acordo com a UBABEF (2012) as exportações avícolas em 2011 somaram 4.118 milhões de toneladas, com alta de 2,3% sobre o ano anterior. Desta forma, o Brasil se constitui no maior exportador mundial de carne de frango e responde por cerca de 40% do comércio mundial.

A produção brasileira de carne de frango chegou a 13.058 milhões de toneladas em 2011, um crescimento de 6,8% em relação a 2010. Com este desempenho o Brasil (terceiro produtor mundial) se aproxima da China, hoje o segundo maior produtor mundial e a expectativa é de que o Brasil termine 2012 na segunda posição do ranking mundial de produtores de carne de frango. Do volume total de frangos produzidos pelo país, 69,8% foi destinado ao consumo interno, e 30,2% às exportações. Em 2011, as exportações da avicultura brasileira (carnes de frango, peru, pato, ganso, e outras aves, ovos e material genético) totalizaram U\$ 8.853 bilhões, com incremento de 19,7% em relação ao ano anterior (UBABEF, 2012).

De acordo com a Federação da Agricultura e Pecuária do Pará (FAEPA) (2012), o Pará produz 130 frangos de corte a cada minuto, 186 mil por dia e um milhão e trezentos mil por semana, gerando um faturamento anual de cerca de R\$600 milhões. Estes números fazem do estado o maior produtor da região Norte e o quarto maior das regiões Norte e Nordeste, sendo que nos últimos cinco anos a produção teve um aumento de 35%, com mais de 100 mil empregos diretos gerados pelos avicultores paraenses.

A produção de frangos está presente em todas as regiões do país, impactando a economia da maioria dos estados. Cerca de 90% das aves abatidas são produzidas no sistema de integração vertical, onde a empresa detém o controle de todos os elos da cadeia, ou seja, produção, abate, processamento e distribuição. Isso gera empregos, renda, fixação do homem no campo e viabiliza a pequena propriedade (UBA, 2008).

A sanidade é um dos grandes atributos do frango brasileiro, fato este que tem elevado à competitividade do frango nacional frente ao mercado externo. Considerando a importância da avicultura para a economia do país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu pela Portaria nº 193, de 19 de setembro de 1994, o Programa Nacional de Sanidade Avícola, o que possibilitou a implantação de normas (Instruções Normativas – IN) para o controle e/ou erradicação das principais doenças das aves, entre elas a micoplasmose aviária (MAPA, IN SDA nº44, de 23 de agosto de 2001), a doença de newcastle (MAPA, IN SDA nº32, de 13 de maio de 2002), a influenza aviária (MAPA, IN SDA nº32, de 13 de maio de 2002) e as salmoneloses (MAPA, IN SDA nº78, de 3 de novembro de 2003).

Os distúrbios entéricos que ocorrem principalmente nas primeiras semanas de vida em muitos mamíferos e espécies aviárias são frequentemente de etiologia viral. Em geral, as patologias ocasionadas por estes agentes em aves são 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, aumento nos índices de mortalidade, gerando sérios prejuízos econômicos aos produtores (YASON e SCHAT, 1987; ALFIERI et al., 2000; ELSCHNER et al., 2005).

Nesse contexto, os mais importantes vírus associados a enterites aviárias são os rotavírus aviários (RVA) (OTTO et al., 2006; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007a), astrovírus (CAstV) (DAY et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007a) reovírus aviário (ARV) (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007a; GOLDENBERG et al., 2010), picobirnavírus (PBV) (ALFIERI et al., 1988; TAMEHIRO et al., 2003) e o coronavírus (ACoV) (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007b). Deste modo, diversos estudos vêm sendo realizados com o enfoque de determinar a prevalência e distribuição destas viroses entéricas em rebanhos comerciais (TAMEHIRO et al., 2003; OTTO et al.,

2006; DAY et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007b; ISLAM et al., 2009; JINDAL et al., 2010a).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ROTAVÍRUS

#### 2.1.1 Considerações iniciais

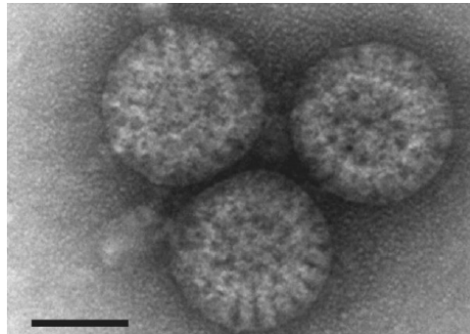
Os rotavírus (RV) são um dos principais agentes etiológicos causadores de gastroenterites agudas, entre crianças e animais jovens (principalmente recém-nascidos) de várias espécies, podendo ser a causa primária ou estarem associados a outros enteropatógenos na gênese dos referidos distúrbios (BARRIOS et al., 1991; PARASHAR et al., 1998; LINHARES, 2000; KAPIKIAN et al., 2001, POLANCO et al., 2004; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007b; WANG et al., 2007).

Bergeland et al. (1977 apud Legrottaglie et al., 1997) foram os primeiros a detectarem os RVA quando estudaram um grupo de perus diarreicos nos Estados Unidos. Em seguida, McNulty et al. (1978) relataram à presença dos RVA por microscopia eletrônica em conteúdo intestinal de perus. Desde então, o RVA já foi encontrado em outras espécies de aves como frangos, patos, pombos, avestruzes faisões e outras aves silvestres (LEGROT TAGLIE et al., 1997, MORI et al., 2002; SILVA et al., 2006; URSU et al., 2011). No Brasil, o RVA foi identificado pela primeira vez por Alfieri et al. (1989a) em amostras de fezes de frango de corte e, desde então, poucos trabalhos foram desenvolvidos em território nacional visando a detecção destes agentes em aves (TAMEHIRO et al., 2003; SILVA et al., 2006; VILLARREAL et al., 2006). Além disso, alguns estudos têm identificado a contaminação ambiental por RV em amostras obtidas de água de esgoto (DUBOIS et al., 1997; SYMONDS et al., 2009).

#### 2.1.2 Organização genômica dos rotavirus

Os RV são classificados como membros da família *Reoviridae*, gênero *Rotavirus*, com diâmetro de aproximadamente 100 nm. A partícula viral é icosaédrica e não envelopada conforme demonstrado na Fig. 1. Os RV apresentam em seu material genético um RNA de fita dupla (RNAfd) dividido em 11 segmentos de ácido ribonucleico com polaridade positiva, envolvido por um triplo capsídeo viral, os capsídeos interno, externo (com 60 espículas distribuídas na superfície) e um core ou núcleo central, intimamente associado ao genoma viral, formado por 18.556 pares de base (pb) (ESTES e COHEN, 1989; ESTES e KAPIKIAN, 2007).

**Figura 1** - Microscopia eletrônica do RVA.

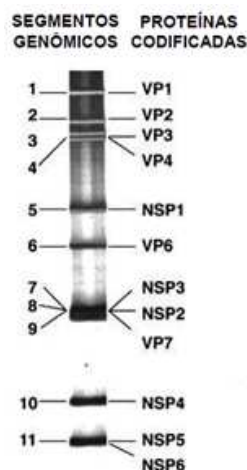


A barra corresponde a 50 nm. Fonte: Trojnar et al. (2010).

Cada segmento genômico (ou gene) regula a síntese de uma proteína viral específica, sendo seis estruturais, denominadas de *viral proteins* (VPs), VP1-VP4, VP6 e VP7, e seis não estruturais (*non structural proteins* - NSPs): NSP1-NSP6 (ESTES e KAPIKIAN, 2007). 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).

Os segmentos 1, 2, 3, 4, 6 e 9 codificam respectivamente as proteínas VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 e VP7, enquanto que os segmentos 5, 7, 8 e 10 codificam as proteínas NSP1, NSP3, NSP2 e NSP4, respectivamente e o segmento 11 codifica as proteínas NSP5 e NSP6. A proteína VP7 pode ser codificada pelos segmentos 7, 8, ou 9 dependendo da amostra viral (CARMONA, 2010) (Fig. 2).

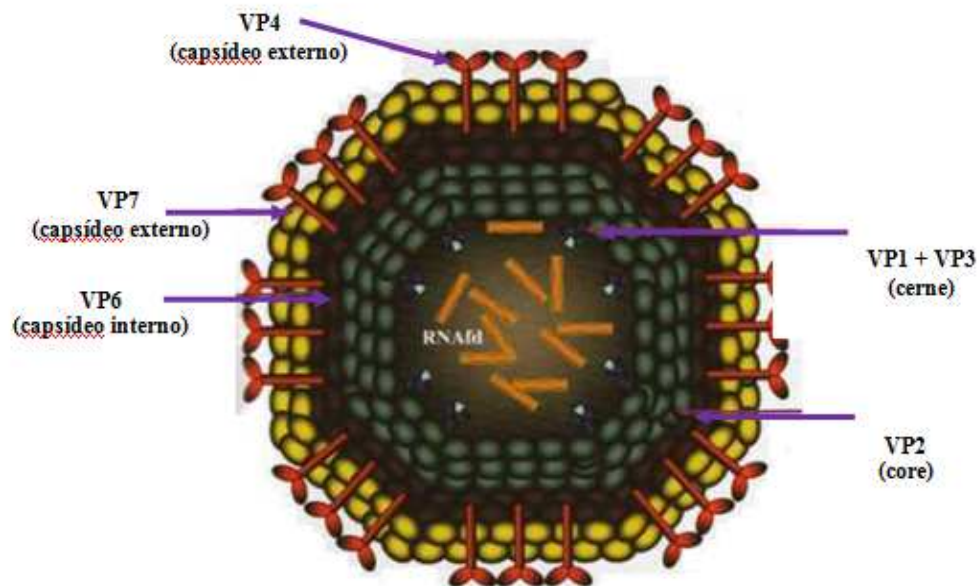
**Figura 2** - Relação dos segmentos genômicos dos RV com as proteínas codificadas.



Fonte: Adaptado de Desselberger et al. (2009).

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 (Fig. 3), 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).

**Figura 3** - Esquema da partícula de RV com a localização das proteínas.



Fonte: Santos e Soares (2008).

As funções das proteínas do RV e suas relações com os segmentos genômicos codificadores estão sumarizadas no quadro 1.

**Quadro 1-** Localização e função das proteínas dos RV.

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

Fonte: Santos e Soares (2008).

De acordo com Santos e Soares (2008), as partículas virais mantêm sua integridade e infecciosidade quando expostas ao fluorocarbono, éter, clorofórmio ou desoxilato. A partícula é estável em pH entre 3 e 9 e pode manter sua infecciosidade por vários meses a 4°C ou -20°C, quando estabilizada com cloreto de cálcio. No entanto, pode ser inativada por fenol, formalina, cloro, sendo o etanol a 95%, provavelmente, o melhor desinfetante, pois remove o capsídeo externo.

Para vírus segmentados existe a possibilidade da ocorrência do fenômeno de reestruturação de segmentos genômicos (*reassortment*) quando no momento da gênese de novas partículas virais, pode-se ter a montagem de partículas que



incluam segmentos pertencentes a cada um dos tipos virais que estavam co-infectando uma célula, gerando um terceiro vírus diferente dos originais. A ocorrência do *reassortment* é um dos mecanismos importantes para a evolução viral e para a geração da diversidade genética não só dos RV, como também de outros vírus segmentados (ABE et al., 2009; FREGOLENTE, 2010; WONG et al., 2012).

### 2.1.3 Classificação em grupos

Os RV apresentam três especificidades antigênicas: grupo, subgrupo e sorotipo/genotipo. A proteína VP6 confere especificidade para grupo e subgrupo e a classificação em grupos é baseada nos seus sítios antigênicos. Os grupos vão de A-G, sendo que o grupo A também pode ser dividido em subgrupos (I, II, I+II, não I e não II) (ESTES E COHEN, 1989; ESTES, 2001; KAPIKIAN et al., 2001).

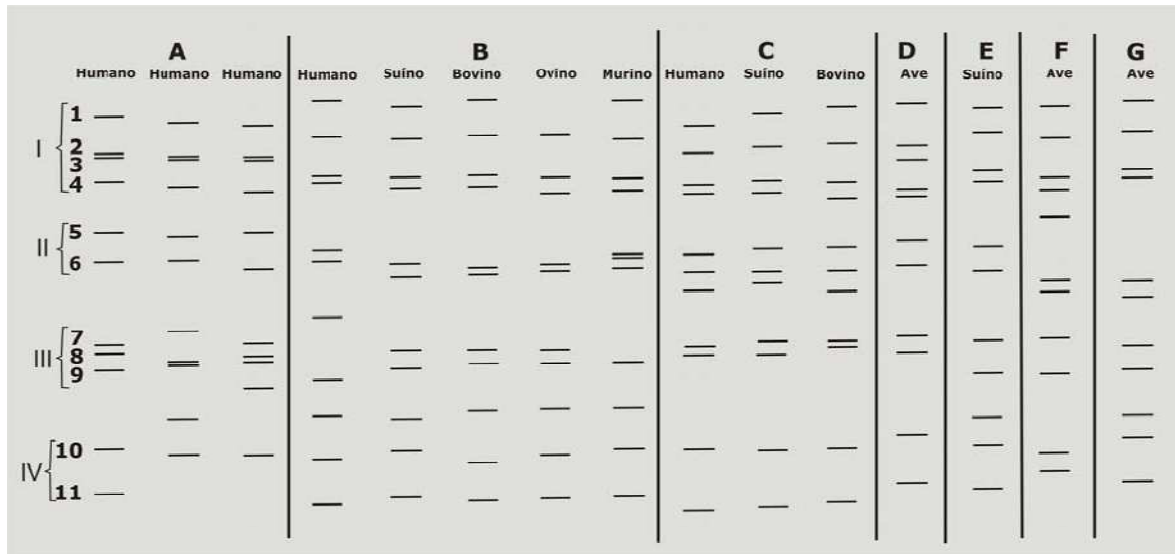
Os RV do grupo A (RV-A) podem ser encontrados em aves e as cepas que não possuem o antígeno de grupo A são designadas de atípicas, sendo que os grupos D, F e G têm sido documentados somente em aves (DEVITT e REYNOLDS, 1993; OTTO et al., 2006; TROJNAR et al., 2010; JOHNE et al., 2011). Os RV-A, B e C são encontrados em seres humanos e outros animais. Os RV-A são os mais importantes epidemiologicamente por estarem associados à maioria das infecções (ESTES e KAPIKIAN, 2007).

### 2.1.4 Perfil eletroforético

De acordo com Desselberger (1996) os RV de origem animal e humana apresentam uma grande variabilidade em seus perfis eletroforéticos, quadro este também observado por Tamehiro et al. (2003) em sua pesquisa com frangos de corte.

Dada à natureza segmentada do genoma viral, este pode ser analisado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). De acordo com a mobilidade de cada segmento, devido à diferença de massa molecular, eles podem ser agrupados em quatro classes: I, englobando os genes 1 a 4; II, 5 e 6; III, 7, 8 e 9; e IV, 10 e 11, como mostra a Fig. 4. Também por meio da EGPA se pode fazer a classificação do perfil eletroforético, baseada na migração do 11º segmento, em longo, curto e super-curto (KAPIKIAN et al., 2001; SANTOS e SOARES, 2008).

**Figura 4** - Demonstração esquemática do padrão de migração eletroforética dos segmentos das amostras de RV dos grupos A a G.

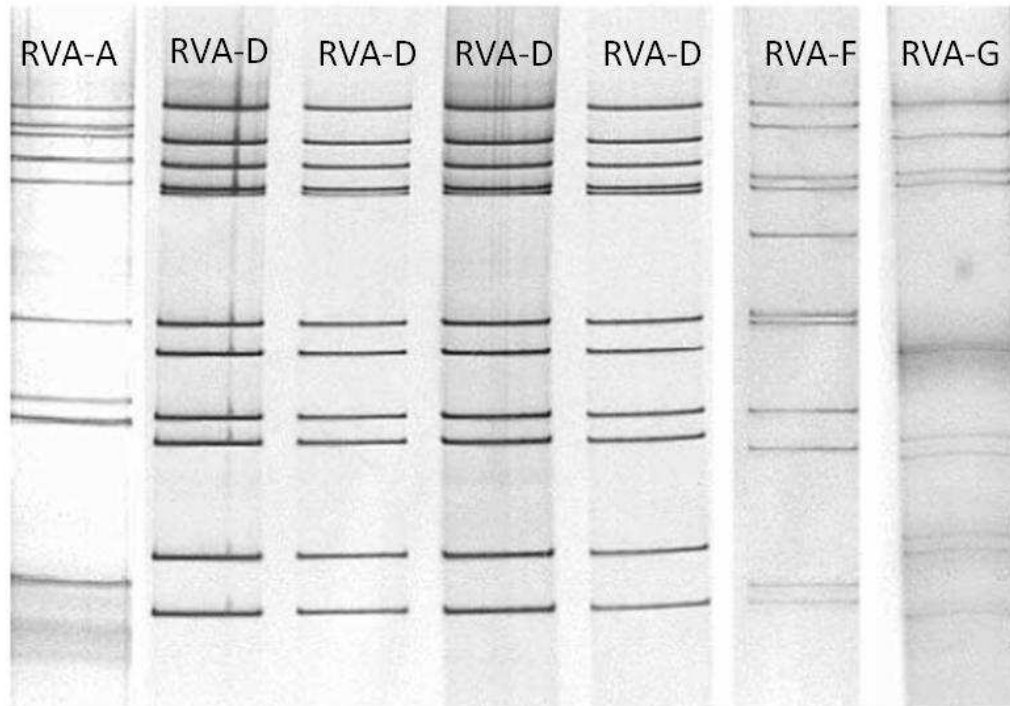


Fonte: Adaptado de Kapikian et al. (2001).

A EGPA é utilizada para distinguir diferentes grupos de RV. Por meio deste método diagnóstico, os 11 segmentos de RNAfd do genoma do RV produzem um padrão de migração eletroforética característico para cada grupo. Contudo, a classificação baseada somente no perfil de migração é problemática devido aos diferentes mecanismos de evolução que os RV podem apresentar (DESSELBERGER, 1996, ALFIERI et al., 2000; ESTES e KAPIKIAN, 2007; SANTOS e SOARES, 2008).

Segundo Otto et al. (2006) os padrões descritos para os rotavírus aviário do grupo A (RVA-A), D (RVA-D), F (RVA-F) e G (RVA-G) são, respectivamente, 5-1-3-2; 5-2-2-2; 4-1-2-2-2 e 4-2-2-3 (Fig. 5).

**Figura 5** - Padrões genômicos observados em RVA



Fonte: Adaptado de Otto et al. (2006).

### 2.1.5 A proteína NSP4

De grande importância na biologia dos RV, a proteína NSP4, é codificada pelo 10º segmento genômico, com 175 aminoácidos (aa) e massa molecular de 28 KDa, sendo a única proteína não estrutural que não se liga ao RNA. É uma glicoproteína não estrutural multifuncional, sintetizada na membrana do retículo endoplasmático, que apresenta um alto grau de flexibilidade conformacional e muito provavelmente existe em diferentes estados oligoméricos e compartimentos na célula infectada (ESTES, 2001; MORI et al., 2002; CHACKO et al., 2011).

A NSP4 vem sendo descrita como a primeira (e única) enterotoxina viral entre as viroses entéricas. Esta se liga aos receptores extracelulares de superfície (integrina), sendo capaz de ativar os canais dependentes de  $Ca^{++}$  no intestino, aumentando os níveis de cálcio intracelular, sendo que esta mobilização de cálcio é seguida por uma resposta secretória de cloreto contribuindo para indução da diarreia (BALL et al.,

1996; ZHANG et al., 2000; DIDSBURY et al., 2011; GIBBONS et al., 2011). De acordo com Gibbons et al. (2011), a teoria mais aceita é a que a NSP4 seria liberada das células infectadas para então interagir com receptores de superfície das células vizinhas desencadeando um evento de sinalização específico, o que resultaria em secreção.

Embora não participe da estrutura do vírus vem sendo muito estudada, devido sua participação na replicação viral e na morfogênese do vírus. O transporte intracelular da NSP4 para a membrana plasmática, sua translocação através desta membrana, além da sua exposição e subsequente secreção ocorre via um não usual e complexo processo célula-dependente (GIBBONS et al., 2011).

O capsídeo externo do triplo capsídeo viral do RV é perdido durante a entrada na célula, gerando partículas de duplo capsídeo (DLP) que ordenam a síntese de uma fita molde de RNA para a síntese do genoma do RNAfd segmentado em corpos de inclusão viral (viroplasma). A NSP4 recruta as DLP formadas nos viroplasmas para o retículo endoplasmático (RE), aonde as partículas serão convertidas em partículas de triplo capsídeo (TLP) via brotamento. Além disso, no retículo endoplasmático, a NSP4 funcionaria como um receptor intracelular para as DLP facilitando a adição da VP7 e VP4. Portanto, a NSP4 seria fundamental para a formação da partícula madura do RV (TAYLOR et al., 1996; NEJMEDDINE et al., 2000; SILVESTRI et al., 2005; DIDSBURY et al., 2011).

Outro conceito interessante é o que classifica a NSP4 como uma proteína formadora de poros (proteína pequena e hidrofóbica que oligomeriza para criar um poro aquoso transmembrana), ou seja, uma viroporina. Estas proteínas alteram as concentrações intracelulares de íons por sua inserção nas membranas intracelulares ou plasmáticas, modificando a permeabilidade destas e perturbando a eletroquímica normal dos gradientes de íons, promovendo, entre outros aspectos, a quebra da homeostase do cálcio, sendo encontradas em uma ampla variedade de famílias de vírus RNA e DNA (HYSER et al., 2010).

Alguns achados tem sustentado a hipótese de que a NSP4 tem um importante papel no estabelecimento da doença e na infectividade espécie-específica. Desta maneira, a NSP4 tem sido considerada um determinante de virulência na infecção por RV (ZHANG et al., 1998; KIRKWOOD et al., 1999; PAGER et al., 2000). No

entanto, Mascarenhas et al. (2007b) demonstraram que a NSP4 pode não ser a única determinante para a virulência do vírus.

De acordo com Didsbury et al. (2011), enquanto o foco primário sobre a NSP4 tem sido seus efeitos patofisiológicos sobre as células intestinais e sua função como uma enterotoxina, os resultados obtidos por estes autores revelam que esta proteína pode ter um amplo tropismo celular e, portanto, pode exercer uma gama maior de efeitos moleculares nos hospedeiros e isto pode ter implicações na patofisiologia desta doença.

A análise sequencial dos genes NSP4 demonstrou que as sequências deduzidas de aminoácidos diferiram muito entre mamíferos e aves. Além disso, há cinco grupos genéticos (genótipos) (NSP4 [A]-[E]) entre as rotavíruses do grupo A estudadas em seres humanos e animais (mamíferos e aves). As amostras de mamíferos foram caracterizadas como genótipos A, B, C ou D, e as de origem aviária como genótipo E (KIRKWOOD e PALOMBO, 1997; CIARLET et al., 2000; MORI et al., 2002; LIN e TIAN, 2003).

Por ser um gene bem conservado e não grupo-específico, alguns estudos de epidemiologia molecular e monitoramento do RVA vêm sendo desenvolvidos utilizando iniciadores específicos para o mesmo, facilitando a detecção do referido agente nos plantéis estudados (DAY et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007a; JINDAL et al., 2010a).

### **2.1.6 Epidemiologia**

A transmissão dos RV ocorre principalmente pela via fecal-oral por meio da ingestão de água e alimentos contaminados com fezes. Durante os episódios diarreicos, pode-se estimar a excreção de aproximadamente um trilhão de partículas virais por mililitro de fezes, sendo que a dose infectante pode ser de 10 partículas (WARD et al., 1986). Segundo Yason e Schat (1987) a transmissão horizontal ocorre facilmente entre aves, seja por contato direto ou indireto (vetores mecânicos/biológicos).

Pantin-Jackwood et al. (2007b) ainda alertam para a possibilidade da transmissão vertical do RVA, enfatizando a necessidade de outros estudos para verificar se os RV poderiam ser transmitidos a outras aves pelos ovos, seja transmissão transovariana ou apenas por sua presença na superfície do ovo.

Considerando a elevada taxa de infecção em todo mundo, a despeito dos padrões de higiene, especula-se que a transmissão dos RV também possa ocorrer via respiratória pela secreção traqueal (SANTOS e SOARES, 2008).

Yason e Schat (1987) verificaram que os perus foram mais sensíveis à infecção experimental com RVA que os frangos, e relataram que a presença de episódios diarreicos em frangos é rara, diferentemente, do observado em perus. Barrios et al. (1991) constataram maior positividade de material genômico do vírus em amostras fecais de frangos assintomáticos do que em aves com sintomatologia. Legrottaglie et al. (1997) isolaram o RVA em um plantel de faisões que apresentavam histórico de diarreia e aumento da mortalidade. Segundo Tamehiro et al. (2003) a possibilidade de diagnóstico positivo para RVA aumentou consideravelmente na análise de amostras pastosas e diarreicas. Villarreal et al. (2006) não observaram diferenças significativas para a detecção de RVA ao analisarem amostras de plantéis com e sem diarreia. Otto et al. (2006) encontraram RVA em 32/34 (94,1%) amostras fecais de frangos de corte da Alemanha que apresentavam distúrbios entéricos.

A pesquisa de RVA em aves assintomáticas merece especial atenção, visto que as mesmas excretam constantemente o vírus sem apresentarem manifestações clínicas aparentes, disseminando o vírus para animais susceptíveis (OTTO et al., 2006; VILLARREAL et al., 2006).

Em geral, as infecções por RVA são mais comuns em aves jovens do que em adultas. No estudo realizado por Theil e Saif (1987) em perus com idades variando entre 3 e 35 dias, a maioria dos casos positivos para RVA ocorreu durante a primeira semana de vida, sendo sugerido que nesta espécie, as infecções se restringiriam quase que exclusivamente ao primeiro mês de vida. Yason e Schat (1987) acreditaram que pela maior demora na substituição das células epiteliais das vilosidades intestinais em aves de maior idade (56 a 70 dias) se comparado com aves de menor idade (1 a 7 dias), as adultas seriam mais susceptíveis as infecções por RVA. Barrios et al. (1991), detectaram RVA em material fecal de frangos com idades variando entre 5 e 60 dias. Tamehiro et al. (2003), demonstraram que o RVA foi um importante agente etiológico de distúrbios entéricos, especialmente em frangos de corte com idades inferior a um mês. Por outro lado, Jindal et al. (2010a)

verificaram que a maioria dos casos positivos para RVA ocorreram em perus com uma semana de idade. Na tabela 1 é demonstrada a frequência dos RVA em alguns estudos ao redor do mundo.

**Tabela 1** – Frequência dos RVA em frangos e perus com base na EGPA e RT-PCR.

<b>País da Pesquisa</b>	<b>Teste utilizado</b>	<b>Positividade</b>	<b>Espécie</b>	<b>Autores</b>
Brasil	EGPA	8,5%	Frangos	Tamehiro et al. (2003)
E.U.A	RT-PCR (gene NSP4)	67,7%	Perus	Pantin-Jackwood et al. (2007b)
E.U.A	RT-PCR (gene NSP4)	46,5% (rebanhos)	Frangos	Pantin-Jackwood et al. (2008)
Bangladesh	EGPA	13,15%	Frangos	Islam et al. (2009)
E.U.A	RT-PCR (gene NSP4)	30,6%	Perus	Jindal et al. (2010a)

Uma grande vertente dos estudos sobre os RV diz respeito à transmissão entre espécies, principalmente a possibilidade de transmissão animais-humanos. Nakagomi e Nakagomi (1991) especularam que devido à natureza ubíqua do RV, uma cepa proveniente de uma espécie animal poderia infectar outra espécie em condições naturais. Estudos vêm sendo desenvolvidos nesta área, baseados principalmente no sequenciamento genético das amostras, abrindo um leque de discussões sobre a ocorrência ou não de infecção heteróloga (ITO et al., 2001; ÇATALOLUK et al., 2005; MASCARENHAS et al., 2007a).

Os relatos dos autores ainda são muito controversos no sentido de admitir a transmissão entre espécies do RV em condições naturais. Brussow et al. (1992), encontraram alta similaridade entre uma amostra de RV-A isolada a partir de um bezerro com diarreia e uma amostra aviária, sugerindo a transmissão entre espécies envolvendo aves e mamíferos. Entretanto, Mori et al. (2002), alertam que esta não é uma evidência direta que o RV de aves possa causar sintomatologia clínica em



bovinos ou outros mamíferos ou que a indução da doença por estes, nos mamíferos, seguiria o mesmo mecanismo patogênico daqueles RV típicos de mamíferos. Por outro lado, Wani et al. (2003) informam que, possivelmente, encontraram a primeira evidência da detecção de um provável RV de mamífero do grupo A em aves.

Infecções simultâneas com outros enteropatógenos (incluindo outros vírus segmentados) nos plantéis de aves são relatadas com frequência na literatura, o que ocasionaria maior gravidade no quadro clínico das aves afetadas (TAMEHIRO et al., 2003; DAY et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007b; JINDAL et al., 2010b).

### **2.1.7 Patogenia e sintomatologia**

O período de incubação do RV varia de dois a quatro dias. O intestino delgado tem na constituição de seu epitélio simples colunar as chamadas células da cripta (precursoras dos enterócitos) e os enterócitos maduros, sendo estas células não proliferativas dispostas sobre as vilosidades, responsáveis pela absorção, síntese de enzimas secretadas em sua porção apical e digestão. Esta camada está constantemente exposta a fatores exógenos, encontrados na luz intestinal (p. ex. nutrientes e patógenos), e sob ação de fatores intrínsecos do organismo, a partir da submucosa (p. ex. peptídeos ativos, hormônios e mediadores inflamatórios). As duas células juntas atuam estabelecendo um fluxo bidirecional de eletrólitos pelo epitélio, com os enterócitos facilitando a absorção, e as células da cripta, a secreção (JONES e BLIKSLAGER, 2002; SANTOS e SOARES, 2008).

De acordo com Santos e Soares (2008) a patogênese dos RV iniciaria com a ingestão de água e alimentos contaminados, chegando posteriormente aos enterócitos maduros (células apicais) das porções média e alta das vilosidades do intestino delgado de animais e de seres humanos, onde ocorre à replicação viral, provocando a descamação dessas células, acelerando a migração das células secretórias da cripta (que não apresentam boa capacidade absorptiva) para as vilosidades, o que leva a quadros graves de diarreia, com excreção do vírus nas fezes. Um componente secretório ocasionado pela ação da NSP4 também ajudaria na gênese da diarreia.

Os frangos são susceptíveis a infecção pelo RVA, mas os sinais clínicos são leves ou ausentes (YASON e SCHAT, 1987). De uma forma geral, a sintomatologia

ocasionada pelos RVA é gastroentérica, visto que os animais apresentam, principalmente, enterite e diarreia, levando-os a anorexia, desidratação, fraqueza e, conseqüentemente, a redução no ganho de peso e uniformidade do rebanho. Além disso, foi observado aumento na susceptibilidade a outras doenças, no custo das medicações, na taxa de mortalidade e queda na produção de ovos (YASON e SCHAT, 1987; DECAESSTECKER et al., 1988; LEGROTTAGLIE et al., 1997).

Frequentemente, estes agentes também são associados à síndrome da refugagem/má-absorção (Runting and Stunting Syndrome) em frangos de corte e perus ou ao complexo entérico das aves (PEC) em perus, com uma de suas manifestações mais graves, a síndrome de mortalidade e enterite das aves (PEMS) (JINDAL et al., 2009, 2010b). Estas síndromes são entéricas e multifatoriais envolvendo outros agentes e fatores ambientais. A PEMS é uma doença que afeta principalmente perus jovens caracterizada por diarreia, desnutrição, aumento do consumo de alimento e tempo de abate. Nas formas mais graves, há disfunção imune e aumento da mortalidade. A forma mais leve desta síndrome é a chamada PEC (BARNES et al., 2000). A síndrome da má absorção é uma doença que produz significativas perdas na produção, já que gera lesões no epitélio da mucosa intestinal resultando em problemas de má digestão e absorção (ou absorção insuficiente) dos nutrientes, associados a problemas de trânsito rápido, caracterizando-se por retardo no crescimento, diarreia e perda de pigmentação das aves acometidas (GARCÍA e COLAS, 2010).

## 2.2 PICOBIRNAVÍRUS (PBV)

### 2.2.1 Considerações iniciais

Pereira et al. (1988), no Brasil, descreveram o PBV pela primeira vez no conteúdo intestinal de ratos. Posteriormente, Alfieri et al. (1988) relataram pela primeira vez a infecção por PBV em frangos de corte. Desde então, viroses com características similares vem sendo detectadas em amostras fecais de seres humanos e de animais, sugerindo que este vírus tem uma ampla variedade de hospedeiros (BROWNING et al., 1991; GALLIMORE et al., 1993; HAGA et al., 1999; COSTA et al., 2004; BHATTACHARYA et al., 2006; MASACHESSI et al., 2007; WANG et al., 2007; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010). Além disso, os PBV também vêm sendo detectados em amostras

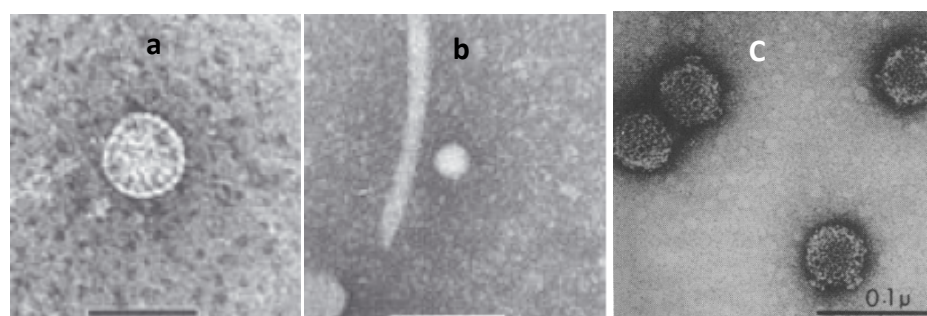
ambientais incluindo esgoto comum e águas de superfície, sendo inclusive utilizados como indicadores de contaminação ambiental (SYMONDS et al., 2009; HAMZA et al., 2011).

O número de viroses associadas às gastroenterites agudas tem aumentado e os PBV vêm sendo incriminados como causas emergentes destas patologias, podendo ou não estar associados a outros enteropatógenos, situação já observada em aves (ALFIERI et al., 1994; TAMEHIRO et al., 2003; WILHELMI et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2007; GANESH et al., 2010).

### 2.2.2 Organização genômica

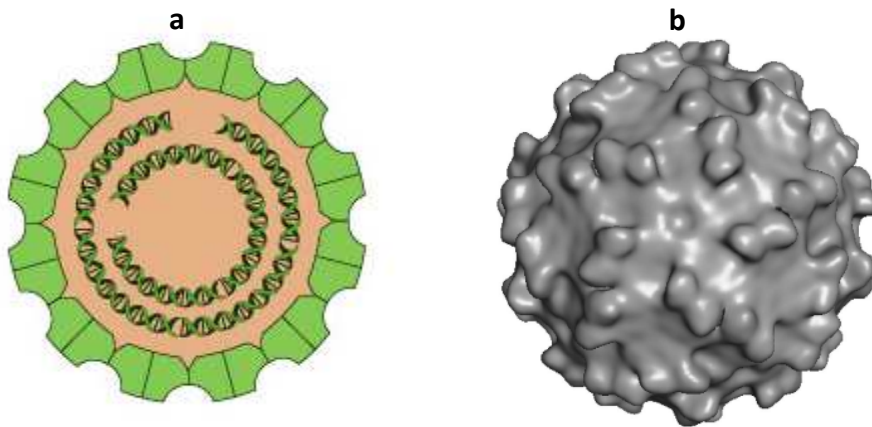
Os membros do gênero *Picobirnavirus*, de **pico**-pequeno, **bi**-bissegmentado e **rna**-RNA, pertencem a família *Picobirnaviridae*, apresentam uma partícula não envelopada de aproximadamente 33-41 nm, contendo um RNAfd em seu genoma envolvido por um capsídeo simples de simetria icosaédrica (Figs. 6 e 7). O tamanho completo do genoma é de aproximadamente 4.200 pb. O maior segmento ou segmento genômico 1 tem 2.2-2.7 kb e codifica a proteína do capsídeo e o menor segmento ou segmento genômico 2 (1.2-1.9 kb) codifica para a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (CHANDRA et al., 1997; HAGA et al., 1999; DUQUERROY et al., 2009).

**Figura 6** - Micrografia eletrônica do RV (a), PBV (b) e Reovírus (c).



A barra corresponde a 100 nm. Fonte: Adaptado de Joklik (1981) e Wang et al. (2007).

**Figura 7** - Picobirnavírus demonstrando seus dois segmentos genômicos (a) e superfície em 3D (b).



Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics (2008); Duquerroy et al. (2009).

As partículas do PBV parecem ser lábeis a ciclos de congelamento e descongelamento (MARTÍNEZ et al., 2003; MASACHESSI et al., 2007). No entanto, o fato de serem vírus RNAfd conta para sua estabilidade e resistência a fatores ambientais (GANESH et al., 2012).

### 2.2.3 Classificação

Com base nas diferenças contidas nas sequências do segmento genômico 2, os PBV são classificados em genogrupos I e II, não-I ou não-II (ROSEN et al., 2000; FREGOLENTE E GATTI, 2009).

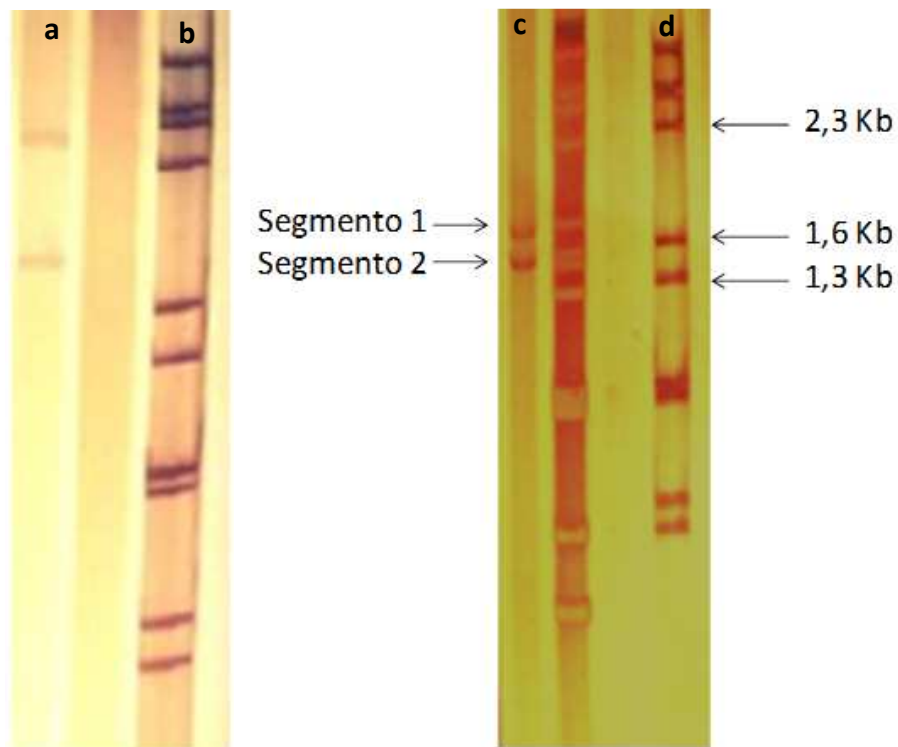
Regiões variáveis no gene que codifica para RdRp geram diversidade entre amostras de mesmo e diferentes genogrupos (BRUENN, 1993). Pesquisas recentes inferem que os genogrupos não apresentam uma especificidade a hospedeiros, ou seja, um mesmo genogrupo pode circular entre diferentes espécies. Além disso, estudos têm observado que os dois genogrupos podem causar infecções mistas no mesmo hospedeiro (BÁNYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GANESH et al., 2011a). A maioria das cepas depositadas no banco de genes pertencem ao genogrupo I e, segundo Ganesh et al. (2012) isto pode representar uma relativa falha na detecção do genogrupo II pelos iniciadores específicos utilizados em espécimes clínicos ou a verdadeira predominância das cepas do genogrupo I ao redor do mundo desde os anos 2000.

### 2.2.4 Perfil eletroforético

Os segmento genômicos 1 e 2 do PBV também são chamados de segmentos ou bandas de lenta e rápida migração, respectivamente (HAGA et al., 1999).

Os PBV apresentam um perfil eletroforético longo, quando o maior segmento ou segmento genômico 1 apresentar aproximadamente 2.2-2.7 kb e o menor segmento ou segmento genômico 2 apresentar 1.2-1.9 kb; ou curto, quando o segmento genômico 1 apresentar aproximadamente 1.75 kb e o segmento genômico 2 apresentar 1.55 kb (Fig. 8) (BHATTACHARYA et al., 2006; GANESH et al., 2010). Bhattacharya et al. (2006) ao estudarem PBV em crianças na Índia, observaram amostras de perfil eletroforético longo em que o segmento 1 do PBV migrou entre o segmento 3 e 4 do RV, enquanto que o segmento 2 do PBV migrou entre o segmento 4 e 5 do RV (Fig. 8).

**Figura 8** - Padrão eletroforético longo e curto do PBV obtido em amostra fecal de criança.



Coluna a (PBV eletroferotipo longo); coluna b (RV-A); coluna c (PBV eletroferotipo curto); coluna d (RV-A). Fonte: Adaptado de Bhattacharya et al. (2006) e Bhattacharya et al. (2007).

Bhattacharya et al. (2007) verificaram significante associação entre amostras de perfil curto do PBV e crianças apresentando diarreia. Ghosh et al. (2009) quando

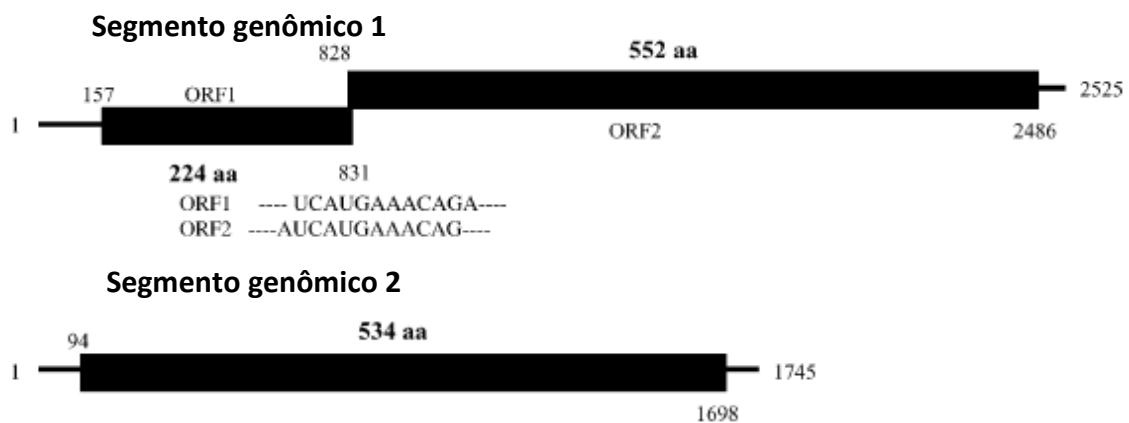
compararam o perfil eletroforético de uma amostra de PBV bovino com um padrão de migração de RNA de RV-A de criança, verificaram que o segmento 1 do PBV migrou próximo ao segmento 2 do RV, enquanto que o segmento 2 do PBV migrou entre o segmento 4 e 5 do RV.

Curiosamente, um terceiro segmento genômico já foi descrito em frangos, entretanto, não está claro se estas cepas são novos vírus com três segmentos genômicos e RNAfd ou representam uma infecção mista com múltiplas cepas de PBV e com tamanhos de segmentos genômicos parcialmente compartilhados (LEITE et al., 1990; GANESH et al., 2012).

### 2.2.5 Segmento Genômico 2 do PBV

Wakuda et al. (2005) demonstraram que o segmento genômico 1 apresenta duas regiões abertas de leitura (ORF) responsáveis pela codificação das proteínas estruturais, enquanto que o segmento genômico 2 apresenta uma ORF simples codificando 534 aa (Fig. 9).

**Figura 9** - Organização genômica dos segmentos 1 e 2 do PBV humano.



Fonte: Wakuda et al. (2005).

As sequências completas e parciais do segmento genômico 2 tem possibilitado análises comparativas revelando elevada heterogeneidade entre as cepas de PBV intra e entre espécies (FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009).

### 2.2.6 Epidemiologia

A excreção do PBV em alguns animais já alcançou sete meses, o que pode enquadrar este vírus em um modelo de infecção persistente ou crônica devido ao longo período de excreção, sugerindo um padrão similar de liberação das partículas em seres humanos e animais infectados, podendo ou não estar associado a quadros de imunossupressão. Portanto, animais adultos assintomáticos e persistentemente infectados são potenciais fontes de infecção, pois podem eliminar o PBV nas fezes por longos períodos servindo como reservatório do agente. No entanto, esta infecção persistente é composta de períodos com alta atividade viral intervalada por períodos de baixa atividade. Vale ressaltar que condições de estresse provocadas pelo manejo dos animais podem contribuir para as altas taxas de detecção do PBV em estudos de população (LUDERT et al., 1991; HAGA et al., 1999; MASACHESSI et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2010; GANESH et al., 2012).

Alfieri et al. (1988) encontraram PBV em 14,17% das amostras provenientes de frangos de corte com idades entre 25 e 35 dias. Tamehiro et al. (2003) identificaram o PBV em aves com maior frequência (16,7%) na sexta semana de vida.

Martinez et al. (2010) identificaram o PBV em 21,1% das amostras fecais estudadas em suínos da Argentina, sendo as fêmeas em lactação as mais acometidas. A tabela 2 demonstra a distribuição dos PBV em aves de alguns países ao redor do mundo.

**Tabela 2 – Positividade para PBV em aves nas Américas.**

<b>País da Pesquisa</b>	<b>Teste utilizado</b>	<b>Positividade</b>	<b>Espécie</b>	<b>Autores</b>
Brasil	EGPA	14,2%	Frangos	Alfieri et al. (1988)
Brasil	EGPA	17,1%	Frangos	Leite et al. (1990)
Brasil	EGPA	3,4%	Frangos	Tamehiro et al. (2003)
Argentina	EGPA	-	Diversas aves de cativeiro	Masachessi et al. (2007)
E.U.A	Análise Metagenômica	-	Peru	Day et al. (2010)

A descoberta de cepas com completa identidade de sequências nucleotídicas originadas a partir de diferentes animais da mesma espécie sugere a transmissão do vírus de animal para animal. A exposição ocupacional de seres humanos a cepas excretadas por animais pode significar risco considerável para a saúde pública, principalmente para veterinários, trabalhadores de abatedouros e moradores de propriedades agropecuárias. Soma-se a estes fatos a presença do PBV em fontes de água naturais ou esgoto, o que pode proporcionar a transmissão entre hospedeiros humanos e animais através de fontes ambientais, alertando para o potencial zoonótico das picobirnaviroses (BÁNYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; GANESH et al., 2010; GIORDANO et al., 2011; GANESH et al., 2012).

### **2.2.7 Patogenia e sintomatologia**

Segundo Fregolente (2010), estudos realizados em ratos infectados experimentalmente com PBV, mostraram que os enterócitos são células permissivas à sua multiplicação. No entanto, esclarecimentos quanto às relações de virulência, patogenicidade e possíveis hospedeiros para esses vírus necessitam de maiores estudos.

Embora, atualmente, os PBV sejam considerados possíveis patógenos entéricos em seres humanos, podendo inclusive causar diarreia persistente em indivíduos imunossuprimidos, estudos em outras espécies animais e seres humanos apresentaram dados contraditórios em relação à associação do PBV com quadros gastroentéricos (GATTI et al., 1989; BROWNING et al., 1991; LUDERT et al., 1991; GALLIMORE et al., 1995; MARTÍNEZ et al., 2003; TAMEHIRO et al., 2003). Em aves, Tamehiro et al. (2003) encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre a excreção do PBV e alteração de consistência das fezes com sinais clínicos de enterite. Bhattacharya et al. (2007), observaram maior frequência da infecção por PBV em crianças entre 6-12 meses com cerca de 12 episódios diarreicos/dia. Por outro lado, Bányai et al. (2008), não encontraram qualquer associação entre suínos positivos para o PBV e a presença de alguma patologia ou sinais clínicos. Desta forma, a possibilidade do PBV ser considerado um patógeno oportunista secundário ou uma virose inócua não pode ser descartada e a sua associação direta com a diarreia necessita ser melhor estabelecida (MASACHESSI et al., 2007; MARTÍNEZ et al., 2010).



## 2.3 REOVÍRUS AVIÁRIO (ARV)

### 2.3.1 Considerações iniciais

O ARV foi isolado em aves pela primeira vez por Fahey & Crawley (1954 apud Goldenberg et al., 2010) e foi inicialmente associado com doença respiratória crônica em frangos. No Brasil, o primeiro isolamento foi em frangos de corte com processos inflamatórios articulares (BOTTINO, 1975). As reovirose aviárias apresentam distribuição mundial, sendo relatados casos em galinhas comerciais e de terreiro (ou fundo de quintal), perus, gansos e outras aves e são a principal causa de artrite e tenossinovite viral (WILCOX et al., 1985; GEORGIEVA e JAMBAZOVA, 2003; CHUA et al., 2007; dos SANTOS et al., 2008).

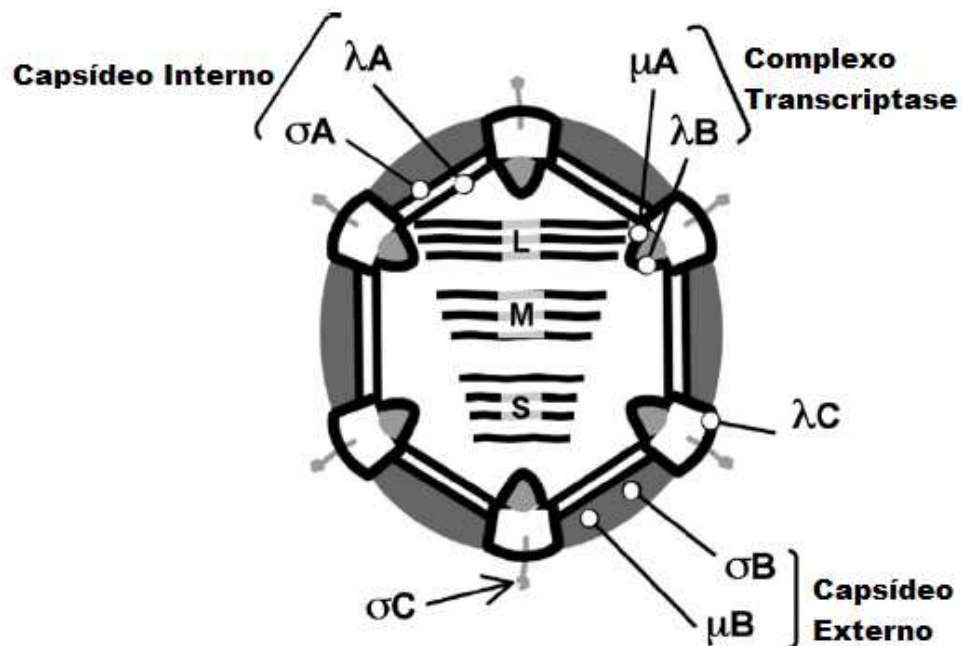
Alguns estudos tem identificado reovírus em amostras ambientais de esgoto (IRVING e SMITH, 1981; SYMONDS et al., 2009). Outros vêm demonstrando que o potencial de transmissão zoonótica dos reovirus relacionados a morcegos para seres humanos estaria ocorrendo regularmente (CHUA et al., 2007, 2011).

### 2.3.2 Organização genômica

Os ARV são membros do gênero *Orthoreovirus*, um dos 12 gêneros da família *Reoviridae*. A denominação REOVírus provém das iniciais de “Respiratory Enteric Orphan”. O ARV é um vírus RNAfd, não envelopado, icosaédrico, com aproximadamente 85 nm de diâmetro (SPANDIDOS e GRAHAM, 1976; BENAVENTE e MARTÍNEZ-COSTAS, 2007; BÁNYAI et al., 2011).

O ARV apresenta em seu genoma viral 10 segmentos os quais são divididos em três classes, designadas como grande (large=L), média (medium=M) e pequena (small=S). A classe L apresenta três segmentos (L1, L2 e L3), a M três (M1, M2 e M3) e a pequena quatro (S1, S2, S3 e S4) (Fig. 10) (SPANDIDOS e GRAHAM, 1976; BENAVENTE e MARTÍNEZ-COSTAS, 2007; BÁNYAI et al., 2011).

**Figura 10** - Representação esquemática do ARV.



Fonte: Adaptado de Benavente e Martinez-Costas (2007).

O genoma viral é de cerca de 23,500 pb e codifica 12 produtos primários de tradução, dos quais oito são proteínas estruturais e quatro não estruturais, identificadas por letras gregas de acordo com a classe dos segmentos genômicos (SPANDIDOS e GRAHAM, 1976; BENAVENTE e MARTÍNEZ-COSTAS, 2007; BÁNYAI et al., 2011).

As proteínas estruturais codificadas pelos genes da classe L são designadas de lambda ( $\lambda$ ), aquelas codificadas pela classe M de mu ( $\mu$ ) e as codificadas pela classe S sigma ( $\sigma$ ) (Quadro 2) (SPANDIDOS e GRAHAM, 1976; BENAVENTE e MARTÍNEZ-COSTAS, 2007; BÁNYAI et al., 2011).

**Quadro 2:** Relação dos segmentos genômicos do ARV e proteínas codificadas.

<b>Segmento Genômico</b>	<b>Proteína</b>	<b>Localização</b>	<b>Função</b>
<b>L1</b>	$\lambda A$	Capsídeo interno	esqueleto para subsequente montagem
<b>L2</b>	$\lambda B$	Capsídeo interno	Trasncriptase
<b>L3</b>	$\lambda C$	Superfície	proteína de ligação com o RNA
<b>M1</b>	$\mu A$	Capsídeo interno	Co-fator para Transcriptase
<b>M2</b>	$\mu B, \mu BN, \mu BC$	Capsídeo externo	Penetração e ativação da transcriptase
<b>M3</b>	$\mu NS, \mu NSC, \mu NSN$	Não estrutural	Formação viral e recrutamento protéico
<b>S1</b>	$\sigma C;$ p10	Capsídeo externo não estrutural	Ligação à célula; permeabilidade/fusão, regula a proliferação celular, sorotipo-especificidade e indução de anticorpos neutralizantes;
	p17	não estrutural	desconhecida
<b>S2</b>	$\sigma A$	Capsídeo interno	liga-se ao RNAfd, resistência ao interferon
<b>S3</b>	$\sigma B$	Capsídeo externo	desconhecida
<b>S4</b>	$\sigma NS$	Não estrutural	ligação ao RNA

Fonte: Adaptado de Benavente e Martínez-Costas (2007); Reck (2011).

Existem no mínimo 10 diferentes proteínas estruturais no vírion, oito das quais ( $\lambda A, \lambda B, \lambda C, \mu A, \mu B, \sigma A, \sigma B$  e  $\sigma C$ ) são produtos de tradução primária dos seus RNAm, enquanto que outras duas  $\mu BN$  e  $\mu BC$ , são originárias da clivagem pós-transducional de seu precursor  $\mu B$ . As duas maiores proteínas não estruturais são as  $\mu NS$  e  $\sigma NS$ , as quais são detectadas no citoplasma das células infectadas

(SPANDIDOS e GRAHAM, 1976; BENAVENTE e MARTÍNEZ-COSTAS, 2007; BÁNYAI et al., 2011).

Outras duas proteínas não estruturais são a p10 e p17 (SPANDIDOS e GRAHAM, 1976; BENAVENTE e MARTÍNEZ-COSTAS, 2007; BÁNYAI et al., 2011). Embora muitos estudos tenham sido desenvolvidos nos últimos 20 anos, diversas questões sobre a estrutura e biologia dos ARV ainda permanecem desconhecidas (BENAVENTE e MARTÍNEZ-COSTAS, 2007).

O ARV é resistente ao pH 3 e mesmo em temperatura de 60°C resiste por 8-10h. Resiste a formalina a 3%, clorofórmio e ao lisol, mas é sensível ao etanol 70%, iodo orgânico 0,5%, hipoclorito de sódio e aos raios ultravioleta (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; GARCÍA e COLAS, 2010). Ciclos de congelamento e descongelamento parecem ser lábeis as partículas do ARV (BENAVENTE e MARTINEZ-COSTAS, 2007).

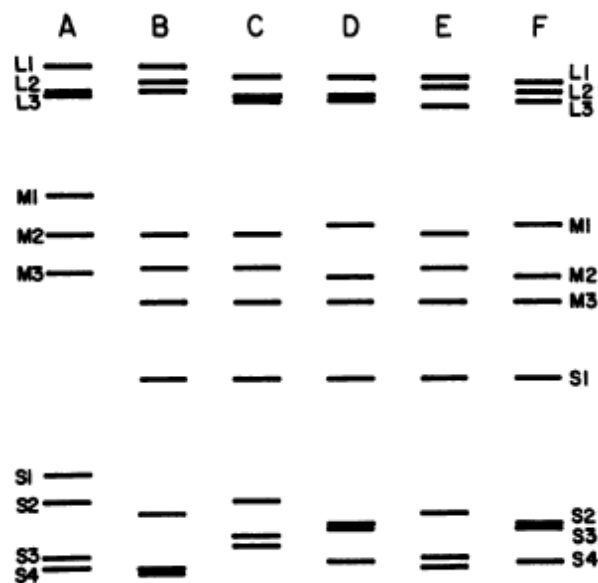
### **2.3.3 Classificação**

As reoviroses são divididas em cinco espécies que inclui as prototípicas reoviroses de mamíferos (MRV) (I), as reoviroses aviárias (II) e Nelson Bay Vírus (NBV) (um vírus isolado em morcegos) e relacionados (III), reovirose de babuíno (BRV) (IV) e as reoviroses de répteis (V). Além disso, estas espécies apresentam características baseadas na habilidade destes vírus em induzir ou não fusão celular e formação de sincício, ou seja, características fusogênicas e não fusogênicas. As MRV não são fusogênicas, enquanto que os demais membros do gênero são fusogênicos. A classificação do ARV em sorotipos é baseada na expressão de antígenos específicos, padrões sorológicos e características de patogenicidade. Atualmente são descritos 11 sorotipos do vírus em aves, sendo os mais comumente diagnosticados: 2408 (mais relacionado aos problemas entéricos); S1133 (problemas locomotores) e o 1733 (entéricos e locomotores) (ZHANG et al., 2006; CHUA et al., 2007; REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; MARSCHANG, 2011).

### 2.3.4 Perfil eletroforético

O trabalho desenvolvido por Gouvea e Schnitzer (1982) demonstrou semelhança na migração de vários segmentos de RNAfd, dentro de uma ampla variedade de amostras de reovírus aviários examinados. Em particular, as bandas M3 e S1 de muitas das amostras dos isolados aviários apresentaram mobilidades idênticas entre si se comparado aos protótipos de mamíferos (Fig. 11).

**Figura 11-** Padrão eletroforético do ARV (linhas B-F) em comparação ao Reovírus de mamífero (linha A).



Fonte: Gouvea e Schnitzer (1982).

No entanto, o segmento S1 aviário apresentou uma mobilidade significativamente diferente dos segmentos S ou M de mamíferos fornecendo um padrão de distinção para as reovirose aviárias. Também não foi possível demonstrar um padrão específico de migração dos segmentos que pudesse ser correlacionado a qualquer sorotipo ou apresentação da doença.

### 2.3.5 Proteína $\sigma A$ do ARV

A proteína  $\sigma A$  codificada pelo segmento genômico S2 é a maior componente do capsídeo interno do vírion e possui atividade de ligação ao RNAfd. Outra função desta proteína está relacionada à resistência do ARV à atividade antiviral do interferon, inibindo a ação da proteína quinase (PKR) por competição pelo RNAfd. Estudos sugerem que a  $\sigma A$  também teria importante função na morfogênese do ARV

e que esta proteína teria como alvo o núcleo das células infectadas (MARTÍNEZ-COSTAS et al., 2000; YIN et al., 2000; XU et al., 2004; VÁZQUEZ-IGLESIAS et al., 2009).

Na pesquisa realizada por Zhang et al. (2006) o segmento genômico S2 foi o alvo para a amplificação por PCR devido a proteína  $\sigma A$  ser a maior proteína do core e provavelmente ser conservada entre as cepas de reovírus.

### **2.3.6 Epidemiologia**

Os reovirus são de distribuição cosmopolita e vêm sendo isolados de uma ampla variedade de hospedeiros como mamíferos, aves, peixes e répteis. A transmissão do ARV ocorre tanto pela via vertical como pela horizontal. A transmissão horizontal é a principal e pode ocorrer de forma direta ou indireta, sendo que a maioria das aves parece se infectar via fecal-oral, já que o agente é excretado pelas fezes e via respiratória, podendo durar cerca de três meses ou mais. A transmissão vertical é conhecida desde 1975 existindo evidências de transmissão via ovo (JONES, 2000; CHUA et al., 2007; REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; MARSCHANG, 2011).

A susceptibilidade das galinhas ao ARV é dependente da idade, visto que as aves adultas são mais resistentes tanto à infecção quanto as lesões induzidas pelo vírus (BENAVENTE e MARTINEZ-COSTAS, 2007). A morbidade pode ser alta, atingindo 100%, já a mortalidade pode variar entre 6-10% (REVOLLEDO e FERREIRA, 2009).

Tamehiro et al. (2003) encontraram ARV em espécimes fecais de frangos de corte analisados por EGPA, sendo que a primeira semana de vida foi a mais acometida e a frequência de diagnóstico desta virose aumentou consideravelmente quando somente as fezes pastosas e diarreicas foram consideradas.

Jindal et al. (2010a) encontraram o ARV em amostras de fezes de perus analisadas por RT-PCR, sendo que a faixa etária mais acometida foi entre 2-3 semanas. A tabela 3 demonstra a distribuição dos ARV em aves em estudos ao redor do mundo.

**Tabela 3** – Ocorrência dos ARV em frangos e perus.

<b>País da Pesquisa</b>	<b>Teste utilizado</b>	<b>Positividade</b>	<b>Espécie</b>	<b>Autores</b>
Brasil	EGPA	9,26%	Frangos	Alfieri et al. (1989b)
Brasil	EGPA	1,8%	Frangos	Tamehiro et al. (2003)
E.U.A	RT-PCR (gene S1)	0%	Perus	Pantin-Jackwood et al. (2007b)
Croácia	RT-PCR (gene S2)	13,04%	Perus	Lojkic' et al. (2010)
E.U.A	RT-PCR (gene S1)	10,4%	Perus	Jindal et al. (2010a)
Brasil	RT-PCR (gene S1)	33,9%	Frangos	Reck (2011)

Alfieri et al. (2000) alertam que, como o ARV é resistente ao calor e a ação de desinfetantes, é possível que o agente permaneça viável em incubadoras e aviários, sendo uma provável fonte de contaminação para as populações subsequentes.

### **2.3.7 Patogenia e sintomatologia**

O período de incubação do ARV está diretamente relacionado com a porta de entrada do vírus, do sorotipo envolvido e a idade da ave, variando de 7 a 11 dias. Após a infecção pelo ARV a replicação viral ocorre principalmente nas mucosas dos tratos digestivo e respiratório, além da bursa de fabricius, seguida de viremia e ampla distribuição do agente para praticamente todos os órgãos em cerca de 24-48h, podendo persistir nas tonsilas cecais, oviduto, baço e articulações. Assim que chega ao fígado, se multiplica nos hepatócitos e após quatro dias também pode ser

observado no coração, rins e articulações (JONES e GEORGIU, 1984; NI e KEMP, 1995; VASCONCELLOS et al., 2001).

As reovirose aviárias têm sido associadas a uma variedade de doenças incluindo as entéricas, imunológicas (ex. imunossupressão) e respiratórias, embora muitas infecções não causem sinais clínicos reconhecíveis em aves. No entanto, a ligação entre a presença do vírus e a doença só tem sido conclusivamente demonstrada em casos de dificuldade na locomoção por inchaço nos membros pélvicos ocasionados pela artrite e tenossinovite. As aves permanecem em decúbito ventral e, com o agravamento da situação, pode ocorrer ruptura do tendão gastrocnêmio e edema do tendão flexor digital, levando a paralisia das extremidades, redução do ganho de peso, piora da conversão alimentar, retardo no crescimento, prostração, palidez das mucosas, despigmentação dos tarsos, plumagem anormal, diarreia, coprofagia, distensão abdominal, aumento da mortalidade (por inanição e desidratação) e condenação de carcaça (JONES, 2000; REVOLLEDO e FERREIRA, 2009; GARCÍA E COLAS, 2010).

Os ARV também são associados à síndrome de má-absorção/refugagem (Runting Stunting Syndrome) e PEC/PEMS (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007b; JINDAL et al., 2010b).

## 2.4 PRINCIPAIS FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS UTILIZADAS NA DETECÇÃO E ANÁLISE MOLECULAR DE VIROSES ENTÉRICAS EM AVES

### 2.4.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

A EGPA é um dos métodos de identificação e caracterização viral amplamente utilizada para a detecção do ácido nucleico dos vírus entéricos RNAfd em aves, sendo comprovadamente proveitoso para a detecção de RNA viral em espécimes fecais. Dentre as suas vantagens estão a simplicidade, economia e rapidez na identificação das diferenças dos padrões de migração dos segmentos genômicos, permitindo a identificação de cepas atípicas; são excelentes testes de triagem para análise da infecção em rebanhos aviários, pois ajudam na epidemiologia molecular por possibilitar a análise de eletroferotipos (THEIL e SAIF, 1987; BARRIOS et al., 1991; LEGROT TAGLIE et al., 1997; ALFIERI et al., 2000;



TAMEHIRO et al., 2003; WANI et al., 2003; VILLARREAL et al., 2006; MASACHESSI et al., 2007).

Entretanto, alguns autores, afirmam ser a EGPA um teste de baixa sensibilidade não detectando, em alguns casos, vírus com baixo nível de excreção ou carga viral nas fezes. A presença de diferentes cepas com o mesmo padrão eletroforético na mesma amostra, pode ser um achado desta técnica (MASACHESSI et al., 2007; CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; OTTO et al., 2012). A EGPA foi a principal técnica usada para detecção e caracterização de PBV até o ano 2000 (MARTÍNEZ et al., 2010).

#### **2.4.2 Reação em cadeia mediada pela polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR)**

A técnica de PCR é utilizada para detecção de muitas viroses que causam gastroenterites, tanto em seres humanos quanto em animais (WILHELM I et al., 2003; JINDAL et al., 2010a; GANESH et al., 2011a).

A RT-PCR tem muitas vantagens em relação aos métodos tradicionais (ELISA, microscopia eletrônica e EGPA), incluindo maior sensibilidade e especificidade na detecção de agentes virais, identificação de múltiplas viroses na mesma amostra, detecção da infecção em animais assintomáticos ou reservatórios, além de não necessitar do cultivo celular (OTTO et al., 2006; DAY et al., 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2007b; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010; NITURE et al., 2010). Embora a importância da RT-PCR esteja bem consolidada, é importante aliar os resultados obtidos nesta técnica com outras ferramentas de diagnóstico disponíveis, gerando maior consistência nos dados obtidos.

No caso do RVA estudos de epidemiologia molecular e monitoramento do RVA vêm sendo desenvolvidos empregando a RT-PCR como ferramenta diagnóstica. O uso de iniciadores específicos para amplificação do fragmento do gene que codifica a proteína NSP4 aperfeiçoa a detecção do referido agente nos plantéis estudados, visto ser uma proteína bem conservada e, dependendo do desenho do iniciador, podem identificar os RVA independente do grupo a qual pertence (DAY et al., 2007; PANTIN-JAKWOOD et al., 2007b; JINDAL et al., 2010a).

Rosen et al. (2000) desenvolveram uma RT-PCR para detecção do PBV em seres humanos, aumentando em cerca de 100 vezes a sensibilidade na detecção dos PBV em espécimes clínicas quando comparadas com a EGPA. A partir daí, os iniciadores desenhados para a detecção do PBV em seres humanos vem sendo utilizados para a detecção do referido agente em animais, sendo que os resultados mais satisfatórios vêm sendo observados na amplificação do genogrupo I do que no II, já que se suspeita que apenas os PBV perfil curto sejam amplificados por este último par de iniciadores. Outra questão importante está no fato de que estes iniciadores teriam uma limitada eficácia em reconhecer todas as cepas de PBV que circulam em várias espécies, permitindo o escape de cepas/genogrupos emergentes, o que explicaria alguns casos de amostras EGPA (+) e RT-PCR (-) (MARTINEZ et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2006; CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009).

Zhang et al. (2006) desenvolveram uma RT-PCR que foi suficientemente sensível e específica para amplificar o segmento genômico que codifica a proteína  $\sigma A$  de 16 independentes cepas de ARV (pato, galinha e ganso), além de ter sido robusto para detectar uma ampla variedade de cepas de reovírus isoladas em campo. No entanto, os autores alertaram que a RT-PCR a partir do cultivo celular é mais sensível (cerca de 15% maior) do que aquele empregado em amostras amplificadas diretamente de espécimes clínicos devido a concentração viral muitas vezes nestes espécimes estar abaixo do limiar de detecção da RT-PCR ou a presença de inibidores de PCR nestas amostras. Mesmo assim, como a propagação viral em cultivo leva mais que sete dias e necessita de linhagem celular especial, a detecção do RNA a partir de espécimes clínicos permanece como primeira escolha visando o diagnóstico precoce das infecções virais.

Otto et al. (2006) encontraram 28 (68,3%) amostras positivas para RVA-A por RT-PCR e seminested PCR de um total de 41 testadas, daquelas somente quatro casos (9,8%) foram confirmados por EGPA. Da mesma forma, Carruyo et al. (2008) identificaram como positivas para PBV 58% (61/105) das amostras que foram negativas pela EGPA. Estes achados confirmam a necessidade de se aliar ferramentas diagnósticas utilizando testes que aumentem a sensibilidade e especificidade do sistema escolhido para detecção de determinado vírus.

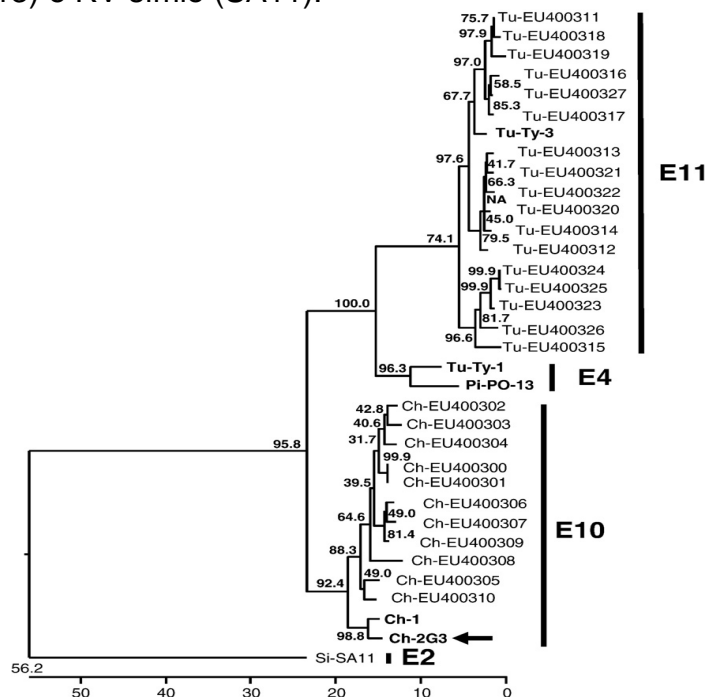
### 2.4.3 Sequenciamento genômico

O sequenciamento genômico propicia a análise comparativa entre as sequências nucleotídicas ou aminoacídicas de diversas cepas, gerando maior conhecimento sobre a diversidade genética dos patógenos recuperados de seres humanos e animais, o que ajuda na compreensão das diferenças na replicação e patogênese das diferentes cepas virais e no monitoramento da emergência de novas variantes (GHOSH et al., 2009).

Pesquisas baseadas no sequenciamento gênico da NSP4 do RVA revestem-se de grande importância epidemiológica, haja vista a confirmação não só da presença do agente viral em rebanhos comerciais, como também a circulação de variantes nos países e propriedades pesquisadas (PANTIN-JACKWOOD et al., 2007b; JINDAL et al., 2010a).

Em trabalho realizado por Trojnar et al. (2009) quando compararam a sequência completa da NSP4 da amostra Ch-2G3 (galinha) com quatro NSP4 provenientes de galinha, peru e pombo, os mesmos confirmaram a especificidade do iniciador desenvolvido e que nas análises comparativas entre sequências de NSP4, em geral, as obtidas em galinhas relacionam-se mais intimamente entre si do que entre as obtidas em perus e pombos (Fig. 12).

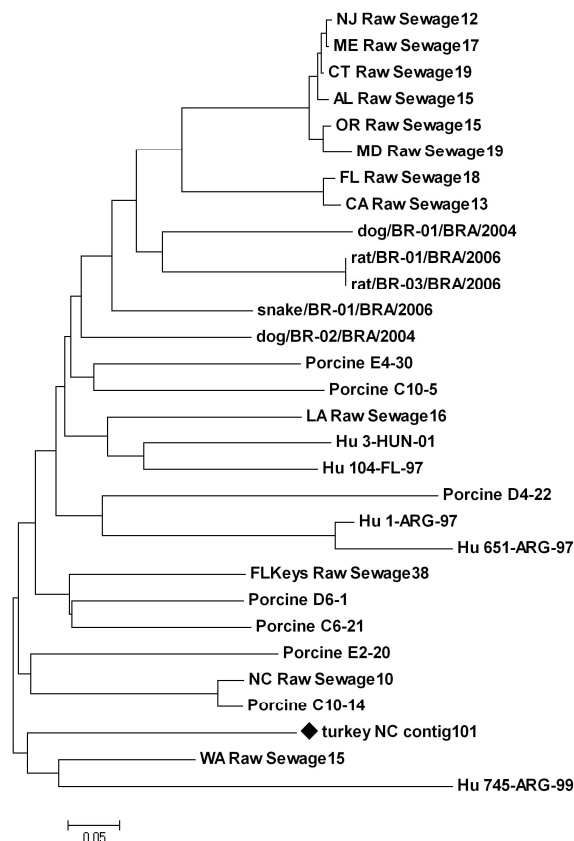
**Figura 12** - Análise filogenética comparando sequência da NSP4 obtida na amostra Ch-2G3 com as correspondentes em galinhas (iniciadas em Ch), perus (iniciadas em Tu), pombo (PO-13) e RV símio (SA11).



Fonte: Trojnar et al., 2009.

Sequências completas do PBV já foram relatadas em algumas espécies (WAKUDA et al., 2005; GHOSH et al., 2009). Entretanto, Day et al. (2010) disponibilizaram a única sequência parcial de PBV em aves até o momento, o que torna de suma importância a obtenção de outras sequências de PBV em aves para que se possa proceder a uma melhor análise comparativa e da relação de identidade entre os PBV aviários e os de outras espécies animais (Fig. 13). A clonagem aliada ao sequenciamento vem fornecendo informações sobre as relações genéticas existentes entre as cepas de animais e humanos, animais e animais além de humanos e humanos, revelando a heterogeneidade genética dos PBV (BÁNYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; GANESH et al., 2011a; GANESH et al., 2012).

**Figura 13** - Árvore filogenética mostrando história evolucionária de um fragmento de 201 pb do PBV em peru (turkey NC contig 101) usado em uma análise metagenômica.



Fonte: Day et al., 2010.

A análise da sequência de nucleotídeos do gene S2 realizada por Zhang et al. (2006) indicou que todos os reovírus de pato (DRV) e gansos (GRV) isolados na China em diferentes localidades e anos foram estritamente relacionados. A análise filogenética demonstrou que o gene que codifica a  $\sigma A$  do DRV/GRV e ARV segregou em diferentes grupos, mas foram mais relacionados entre si do que com os demais

(MRV e BRV). Em outro estudo, realizado em frangos de corte, Bányai et al. (2011) verificaram que a comparação entre os três genes S2 de distintas cepas demonstraram alta similaridade entre si.

Carruyo et al. (2008) alertaram para a possibilidade de se obter diferentes sequências originadas de uma mesma amostra, o que pode ser fruto do reconhecimento dos iniciadores a diversas cepas presentes em uma mesma amostra.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os estudos conduzidos até o momento demonstram que a diversidade das amostras de agentes virais entéricos circulantes no mundo é ampla. Portanto, em países como o Brasil, onde tipos não usuais são encontrados frequentemente e elevadas taxas de infecções mistas são detectadas, a caracterização das amostras de RV e outros vírus entéricos isolados a partir de aves é muito importante para investigações epidemiológicas, ajudando na compreensão do papel de cada um destes agentes patogênicos na gênese dos processos gastrentéricos (RÁCZ et al., 2000).

Em Belém um estudo detectou a presença de RV em crianças com diarreia internadas na Santa Casa de Misericórdia do Pará com perfil eletroforético similar ao de amostras originárias de aves (GUSMÃO et al., 1994). Embora esta evidência tenha ocorrido em amostras de seres humanos, a região norte ainda carece de comprovação da circulação de RV e outros vírus entéricos em aves, visto que até o momento, nenhum estudo desta natureza relatou a presença de tais agentes na região norte do Brasil, demonstrando o pioneirismo deste estudo. Com isso, as evidências demonstrando que os RV são capazes de atravessar a barreira espécie-hospedeiro, alertam para o potencial risco a saúde pública que estes agentes representam (MARTELLA et al., 2010).

Ito et al. (2001) ao apresentarem pela primeira vez a sequencia completa do genoma do RVA, destacaram que o acúmulo de informação sobre os mesmos é importante para avaliar o relacionamento genético entre as rotavirose aviárias e de mamíferos, o que ajudaria a determinar se a transmissão cruzada ocorre entre diferentes espécies. Segundo Elschner et al. (2005), para investigar a presença de diferentes tipos de RVA é necessário isolar e caracterizar mais cepas. Obter um melhor entendimento sobre a estrutura e biologia molecular desses vírus com genoma segmentado de dupla fita pode propiciar um eficaz delineamento de estratégias para prevenir as perdas econômicas na indústria avícola, pela geração de vacinas e sistemas diagnósticos eficazes (BENAVENTE e MARTÍNEZ-COSTAS, 2007).

Segundo a FAEPA (2012), o Pará ocupa o 13º lugar no rebanho nacional de frangos com a avicultura crescendo a cada ano e ocupando posição de destaque no

cenário produtivo do Estado. Neste contexto, a Mesorregião Metropolitana de Belém assume grande importância econômica, pois nesta região se concentra a maior produção avícola do Estado, justificando sua escolha para o desenvolvimento desta pesquisa. Assim, considerando a evolução do plantel avícola do Pará, e em especial da região metropolitana de Belém nos últimos anos, é importante se proceder à pesquisa de RV e outros vírus entéricos em aves identificando possíveis fatores que impeçam o perfeito desenvolvimento da atividade e o envolvimento direto e/ou indireto destes agentes na queda de produtividade das aves, bem como seu potencial risco para a saúde pública.

Desta forma, os dados obtidos auxiliarão o empresário do setor na identificação de possíveis pontos de entraves da produção avícola, propiciando a tomada de medidas profiláticas que minimizariam cada vez mais as perdas sofridas pela indústria em questão, principalmente no que tange ao concurso de doenças infecciosas nos plantéis de aves situados na Mesorregião Metropolitana de Belém.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

- Investigar a ocorrência de rotavírus, picobirnavírus e reovírus em aves criadas em granjas situadas na Mesorregião Metropolitana de Belém, no período compreendido entre 2008 a 2011.

### 4.2 ESPECÍFICOS

- Detectar RVA, PBV e ARV em espécimes fecais de aves usando ferramentas moleculares;
- Identificar os eletroferotipos de RVA-A, PBV e ARV;
- Verificar a frequência de RVA, PBV e ARV em alguns municípios da Mesorregião amostrada;
- Obter informações epidemiológicas, analisando-as estatisticamente quanto a sua significância;
- Comparar as sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas dos fragmentos dos genes NSP4 dos RVA-A, RdRp do PBV e S2 do ARV com sequências descritas em outros locais.



## 5 METODOLOGIA

### 5.1 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 (Anexo A). Os responsáveis pelas granjas assinaram o termo de anuência (Anexo B), permitindo a visita dos pesquisadores no estabelecimento para a colheita amostral viabilizando 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 as 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.

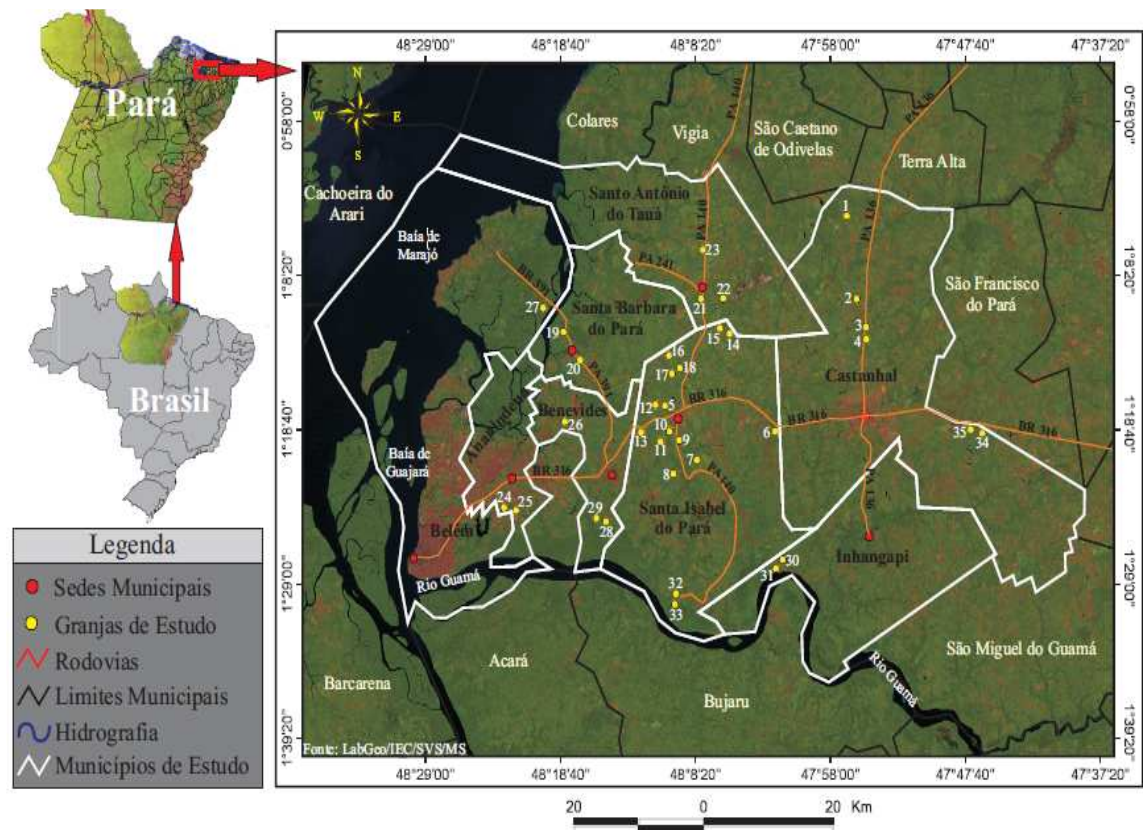
Os procedimentos técnicos de manipulação das amostras, tais como preparo das suspensões fecais obtidas das aves seguidas de extração do RNA que viabiliza a pesquisa de RVA, PBV e ARV, foram realizados em cabine de nível de segurança biológica classe 2 B II. Os resíduos das alíquotas das amostras utilizadas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

### 5.2 ÁREA DE ESTUDO

A área de escolha para o desenvolvimento desta pesquisa foi a Mesorregião Metropolitana de Belém Pará, composta por onze municípios (Ananindeua, Barcarena, Belém, Benevides, Bujaru, Castanhal, Inhangapi, Marituba, Santa Isabel do Pará, Santa Bárbara do Pará e Santo Antônio do Tauá) com grande proximidade da capital (Belém) e da base de processamento dos materiais (Ananindeua). Destes,

oito municípios (Belém, Ananindeua, Benevides, Castanhal, Santa Isabel do Pará, Inhangapi, Santa Bárbara do Pará e Santo Antônio do Tauá) foram selecionados para a realização do estudo, no período compreendido entre outubro de 2008 a maio de 2011(Fig. 14).

**Figura 14** - Municípios em que foram realizadas as colheitas das amostras.



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

Os municípios da Mesorregião citada apresentam climas que vão do equatorial megatérmico úmido ao tropical úmido com temperaturas oscilando entre 20°C e 37°C e umidade relativa do ar entre 80% e 85% (Secretaria Executiva de Estado de Planejamento, Orçamento e Finanças, 2006). De acordo com a Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará/ADEPARÁ (2006), existiam 180 granjas cadastradas nesta Mesorregião. Contudo, segundo a ADEPARÁ (2012) atualmente, encontram-se cadastradas 193 granjas.

### 5.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS

A colheita das amostras foi realizada a partir do material fecal de espécies de aves do gênero *Gallus gallus*, provenientes de 37 granjas distribuídas em municípios da Mesorregião Metropolitana de Belém, considerando a frequência de positividade observada em granjas na literatura ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 4). As granjas foram escolhidas segundo a disponibilidade das integradoras participantes e o número de espécimes fecais colhidos foi de acordo com a distribuição das granjas por município. Foram colhidas amostras em no mínimo 30% dos aviários (ou galpões) existentes em cada granja a qual foi visitada uma única vez.

**Tabela 4** - Relação das granjas e galpões colhidos por municípios.

Município	Granjas Colhidas	Data Colheita	Nº de galpões colhidos
Ananindeua	Granja 24	03.10.08	04
	Granja 25	02.01.09	03
Belém	Granja 27	02.06.09	03
	Granja 36	02.12.09	02
Benevides	Granja 26	02.04.09	03
	Granja 28	31.07.09	04
	Granja 29	31.07.09	03
	Granja 37	10.09.09	02
Castanhal	Granja 1	19.08.10	03
	Granja 2	19.08.10	01
	Granja 3	16.09.10	01
	Granja 4	16.09.10	01
	Granja 34	27.01.09	04
	Granja 35	14.04.09	02
Inhangapi	Granja 30	05.02.09	04
	Granja 31	01.01.09	03
Santo Antônio do Tauá	Granja 21	10.05.11	01
	Granja 22	10.05.11	01
	Granja 23	10.05.11	02
Santa Bárbara	Granja 19	13.04.10	01
	Granja 20	13.04.10	03
Santa Isabel	Granja 5	27.04.10	01
	Granja 6	04.05.10	01
	Granja 7	20.05.10	02
	Granja 8	20.05.10	02
	Granja 9	10.06.10	02
	Granja 10	10.06.10	04
	Granja 11	10.06.10	03
	Granja 12	17.06.10	02
	Granja 13	17.06.10	02
	Granja 14	01.07.10	01
	Granja 15	01.07.10	01
	Granja 16	15.07.10	02
	Granja 17	15.07.10	01
	Granja 18	05.08.10	04
Granja 32	02.12.09	03	
Granja 33	02.12.09	03	
Total	37	-	85

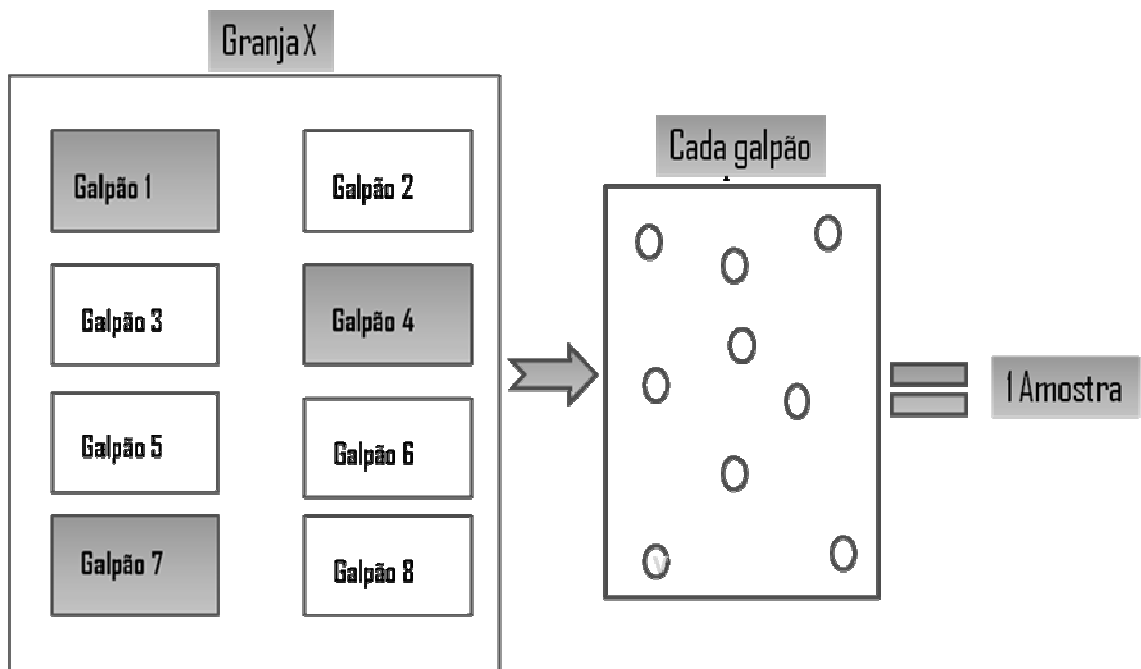
Foram colhidos 85 *pools* de material fecal (amostras fecais depositadas sobre as camas) pertencentes a nove pontos distintos de cada aviário, escolhidos

aleatoriamente. Cada *pool* fecal correspondia a uma amostra, sendo representativa da população daquele lote de acordo com o realizado por Tamehiro et al. (2003). Um exemplo de aviário é mostrado na Fig. 15 e a representação esquemática da colheita é apresentada na Fig. 16.

**Figura 15** - Aviário em que foi realizado uma das colheitas.



**Figura 16** - Representação esquemática da colheita realizada.



As colheitas foram realizadas em no mínimo 30% dos galpões, em nove pontos distintos de cada galpão, equivalendo a uma amostra.

Por conveniência, cada pool de amostras colhido recebeu a denominação de “amostra”. As amostras foram agrupadas em três faixas etárias variando de 1 a 45 dias. Da mesma forma, foram agrupadas por integradoras, sendo que três concordaram em participar e assinaram um termo de anuência permitindo as colheitas (Anexo B). Segundo Paulilo (1990) a integradora fornece ao integrado, a ave de um dia, a ração para alimentação do mesmo, e a assistência técnica. O integrado se responsabiliza pela construção dos aviários e instalação dos respectivos equipamentos, de acordo com as determinações da integradora, e entrega a ave para a integradora quando a mesma estiver com o peso apropriado para abate. Duas granjas incluídas neste estudo não faziam parte de nenhuma integradora, conseqüentemente, quatro amostras não foram analisadas quanto à participação em integradoras. Nenhuma informação sobre o estado de saúde das aves foi requisitada.

Os galpões foram divididos por condição de densidade populacional, segundo informações obtidas no trabalho de Manno et al. (2011). Portanto, as granjas foram divididas em  $\leq 9$  aves/m<sup>2</sup> e  $>9$  aves/m<sup>2</sup>. Em 13 amostras provenientes de cinco granjas não foi possível a classificação de densidade, visto que as granjas não forneceram esta informação. As amostras também foram analisadas quanto à estação do ano em que foram obtidas. Desta forma, foram agrupadas em duas estações climáticas, como citado por Lima et al. (2009), a estação “mais chuvosa” ou “inverno amazônico” que ocorre entre dezembro e maio, e a estação “menos chuvosa” ou “verão amazônico” de junho a novembro.

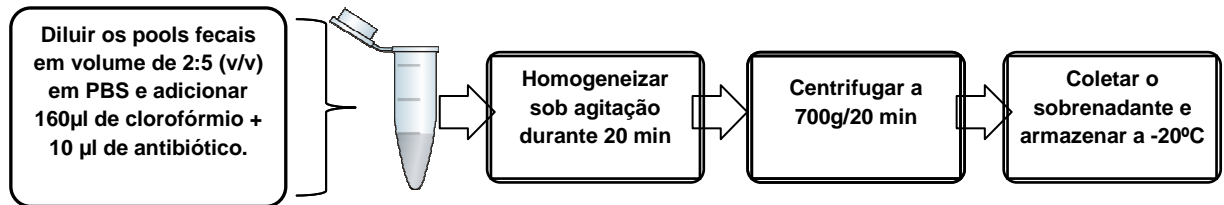
Após a colheita, as amostras foram mantidas sob refrigeração em recipientes estéreis até sua chegada à Seção de Virologia (Laboratório de Rotavírus) do IEC, onde foram mantidas a -20°C até seu processamento. No ato da colheita, informações sobre a idade e densidade de cada galpão amostrado foram coletadas.

#### 5.4 SUSPENSÕES FECAIS

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,2 a 7,4, com adição de clorofórmio e solução de antibiótico composta de penicilina (100UI/ml) + estreptomicina (100µg/ml) a fim de proceder a extração do RNA viral (WHO, 2004). A seguir as amostras foram submetidas à homogeneização sob agitação durante 20 minutos, sucedendo-se a centrifugação 700 x g por 20

minutos. O sobrenadante foi coletado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização dos testes (Fig. 17).

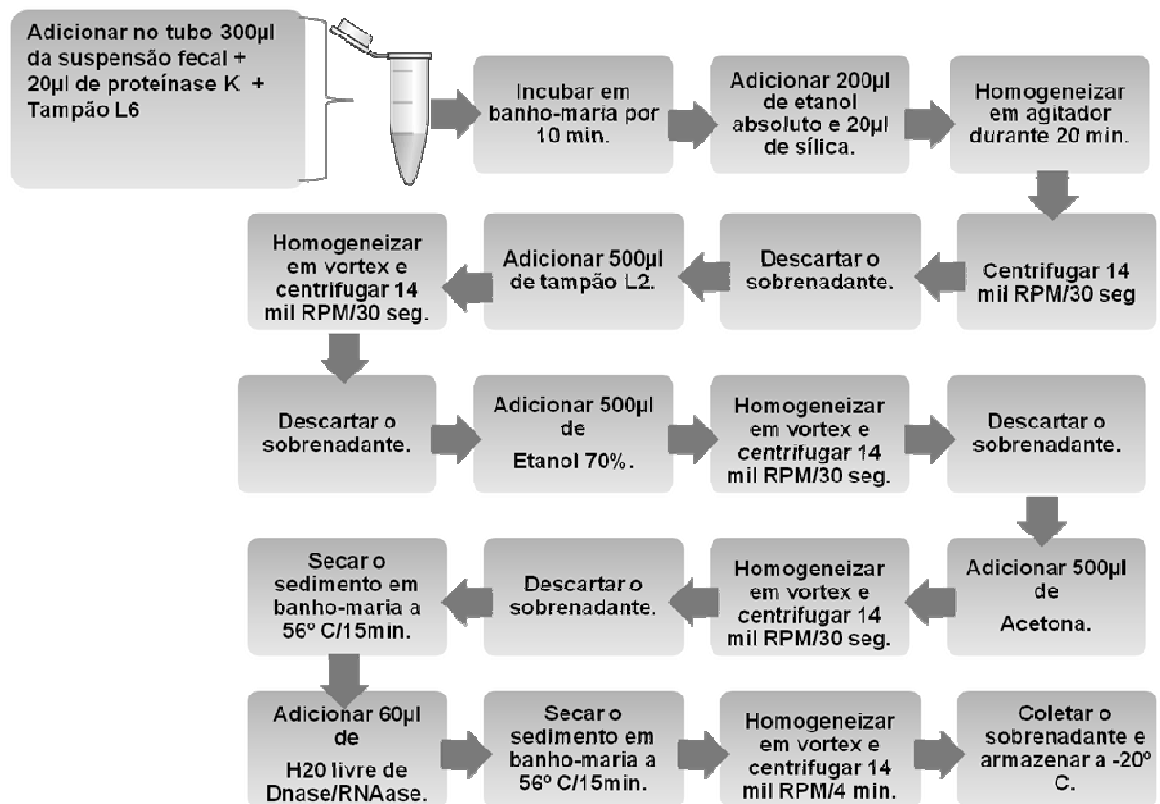
**Figura 17** - Representação esquemática do preparo das suspensões fecais.



## 5.5 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 está esquematizada resumidamente na Fig. 18.

**Figura 18** - Representação esquemática da extração do genoma viral.





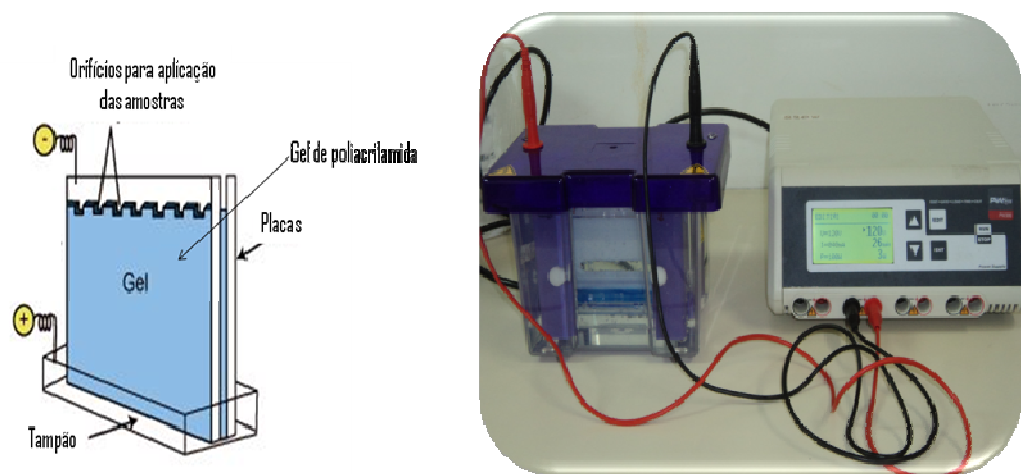
## 5.6 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

### 5.6.1 EGPA

Todas as amostras tiveram seus RNA extraídos e submetidos à EGPA segundo a técnica desenvolvida por Pereira et al. (1983) visando à detecção de RVA, PBV e ARV, bem como a análise dos perfis eletroforéticos.

Dez microlitros de cada RNAfd extraído foram misturados à 2 $\mu$ l de azul de bromofenol e aplicados 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 milliampéres por 2 a 4 horas, aproximadamente (Fig. 19). Após a corrida, as bandas foram fixadas com o uso de etanol e ácido acético, coradas com nitrato de prata e reveladas utilizando-se hidróxido de sódio 10M e formaldeído a 37%. O padrão eletroforético foi visualizado em negatoscópio de luz branca.

**Figura 19** - Representação esquemática da EGPA.





### 5.6.2 RT-PCR

Todos os RNA virais também foram submetidos à RT-PCR, a qual foi realizada em duas etapas. A primeira etapa consistiu na obtenção do DNA complementar (cDNA) específico para cada agente viral por meio de transcrição reversa, e a segunda etapa consistiu na amplificação pela PCR, empregando-se os pares de iniciadores de acordo com Rosen et al. (2000) para PBV, Zhang et al. (2006) para ARV e Trojnar et al. (2009) para RVA (Quadro 3).

**Quadro 3** - Iniciadores utilizados na RT-PCR para amplificação de genes do RVA, PBV e ARV.

Iniciadores	Sequência	Gene	Fragmento Amplificado (pb)
Seg 10-c-s (+) Seg 10-c-s (-)	5'- GGAAAGATGGAGAACGYACCA - 3' 5' – GTTGGGGTACCAGGGATTAAG – 3'	NSP4 (RVA)	642
PicoB25 (+) PicoB43 (-)	5' – TGGTGTGGATGTTTC – 3' 5' - A(GA)TG(CT)TGGTCGAACTT – 3'	RdRp (PBV)	201
PAF (+) PAR (-)	5' – ACTTCTTYTCTACGCCTTTTCG – 3' 5' – ATYAAWDCWCGCATCTGCTG – 3'	S2 (ARV)	~625

A desnaturação do RNAfd foi realizada a 97°C durante 5 minutos seguido de choque em gelo durante 5 minutos. A obtenção do DNA complementar (cDNA) ocorreu por meio de transcrição reversa (RT) seguido de amplificação pela PCR. Para a obtenção do cDNA 3 µL do RNAfd extraído foi adicionado ao par de iniciadores. A transcrição reversa foi realizada para um volume final de 25 µL contendo 16,5 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e DNase, 2,5 µL de tampão 10x (Invitrogen), 1 µL de dNTPs (10 mM Invitrogen) 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), 0,25 µL de RT (20 U, Invitrogen), e 0,5 µL de cada iniciador (20 mM, Invitrogen). A reação foi incubada a 42°C por 1 hora.

Em seguida, os produtos da RT-PCR (cDNA) foram submetidos à amplificação pela técnica de PCR sendo adicionados reagentes contendo: 18,5µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e DNase, 2,5µL de 10x tampão First-stand (Invitrogen), 3µL de DNTPs (10 mM; Invitrogen), 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM; invitrogen), 0,25µL de DNA

polimerase (2,5U/ $\mu$ L Taq DNA Polymerase, Invitrogen), ficando o volume final da reação em 50 $\mu$ L. A PCR foi processada segundo condições apresentadas no quadro 4.

**Quadro 4** - Condições utilizadas na PCR para amplificação de genes do RVA, PBV e ARV.

Condições	Vírus		
	RVA	PBV	ARV
Desnaturação Inicial/Tempo	94°C/3 min	94°C/5 min	93°C/3 min
Nº de ciclos	35	35	35
Desnaturação/Tempo	94°C/1 min	94°C/45 seg	93°C/1 min
Hibridização/Tempo	50°C/1 min	45°C/30 seg	53°C/1 min
Extensão/Tempo	72°C/2 min	72°C/1 min	72°C/1 min
Ciclo final/Tempo	68°C/7 min	72°C/10 min	68°C/7 min

### 5.6.3 Eletroforese em gel de agarose

A análise dos produtos da PCR (amplicons) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão tris base, ácido bórico EDTA-0,5M (TBE) e H<sub>2</sub>O livre de RNase e DNase. Após completa dissolução do gel pelo aquecimento em microondas durante aproximadamente um minuto a uma temperatura de 50°C, seguido de resfriamento a TA (20-25°C), foi adicionado 1 $\mu$ l de SYBR Safe DNA gel (Invitrogen) para cada 10 ml de agarose/TBE, aguardando-se em seguida, a completa solidificação do gel em cuba de eletroforese horizontal.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese durante 60 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 120 V e 400 mA, respectivamente e visualizados em transiluminador com emissão de raios ultravioleta (UV) em sistema de foto documentação, GEL DOC 1000 BIO RAD.

### 5.6.4 Purificação e quantificação

As amplificações foram purificadas usando o kit QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification (Invitrogen), de acordo com a metodologia do fabricante. Após purificação, os amplicons foram submetidos à eletroforese como citado no item anterior, para a realização da quantificação do DNA. A quantificação do DNA foi feita pela

comparação dos amplicons com o Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) aplicado no mesmo gel das amostras purificadas. Após a purificação e quantificação dos amplicons foi realizado o sequenciamento direto de nucleotídeos.

#### 5.6.5 Clonagem e sequenciamento

A técnica de sequenciamento em ambos os sentidos foi realizada segundo o protocolo descrito pelo fabricante do kit Big Dye Terminator (Applied Biosystems) com os iniciadores usados na RT-PCR e submetendo-as ao sequenciador automático (ABI PRISM 3100, Applied Biosystems). Desta forma, a reação de sequenciamento foi conduzida com a utilização de 2 µL de iniciador, 2 µL de tampão 5x para sequenciamento (Applied Biosystems), 2 µL de Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing RR-100 (Applied Biosystems), um volume de até 5 µL de DNA (dependente da quantificação do DNA) e água em quantidade suficiente para um volume final de 10 µL da reação.

As amostras foram selecionadas para o sequenciamento com base na sua qualidade de produto da PCR e contexto epidemiológico.

Portanto, no caso do RVA, excetuando-se Santa Bárbara, pelo menos uma amostra por município positivo foi selecionada para o sequenciamento a partir de seus produtos de PCR. Sendo assim, 20 fragmentos amplificados do gene NSP4 oriundos de amostras pertencentes a municípios que apresentaram granjas positivas foram sequenciados diretamente a partir do resultado da RT-PCR.

Em relação ao PBV, análise preliminar dos cromatogramas das primeiras seqüências obtidas diretamente a partir da RT-PCR, sugeriu a coexistência de populações heterogêneas de amplicons. Desta forma, pelo menos uma amostra por município positivo foi selecionada para clonagem a partir de seus produtos de PCR. O principal objetivo da clonagem foi melhorar a qualidade dos cromatogramas que estavam sendo gerados pelo sequenciamento direto a partir da RT-PCR, solucionando o problema do sequenciamento ambíguo. Então, 13 fragmentos amplificados do gene RdRp foram clonados em vetor (pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> - Invitrogen) e amplificados em células competentes (*E. coli* DH5α - Invitrogen). Assim, de cinco a dez clones por amostra foram testados para PBV usando os iniciadores vírus-específicos PicoB25<sup>+</sup> e PicoB43<sup>-</sup>. Ao final, entre 4 e 5 clones com plasmídeos

positivos foram sequenciados. Para efeito de construção da árvore filogenética, quando clones provenientes da mesma amostra fecal apresentaram 100% de identidade nucleotídica, estes formaram uma única sequência na comparação com as demais (FREGOLENTE, 2010).

A clonagem foi realizada utilizando o Kit TOPO TA Cloning<sup>®</sup> (Invitrogen) conforme protocolo do fabricante usando uma mistura de 3 µL do produto de PCR recente, 1 µL de solução salina e 1 µL do vetor. Para a transformação por choque térmico das células competentes foram adicionados 5 µL dos plasmídeos contendo os fragmentos inseridos. As bactérias transformadas foram plaqueadas no meio Luria-Bertani medium (LB), contendo ampicilina (100 mg/ml) mais IPTG (0,1 mM) e X-Gal (20 µg/mL). As colônias recombinantes, identificadas pela coloração branca foram transferidas para o meio líquido LB contendo ampicilina (100 mg/ml), incubadas sob agitação a 37°C por 12 h a 250 rpm e, posteriormente, submetidas à RT-PCR com os iniciadores específicos para o gene RdRp utilizando as mesmas condições descritas anteriormente afim de confirmar a presença do inserto.

Pelo menos duas amostras por município positivo foram selecionadas para o sequenciamento, no caso do ARV. Desta forma, 15 fragmentos amplificados do gene S2, oriundos de amostras pertencentes a municípios que apresentaram granjas positivas foram sequenciados a partir do resultado da RT-PCR.

#### **5.6.6 Análise das sequências**

As sequências obtidas para os genes estudados 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 (Quadros 5, 6 e 7). As árvores filogenéticas foram construídas empregando-se o programa MEGA (v.5.05), pelo método de “Neighbour-Joining”, baseado nos parâmetros de Kimura (1980), utilizando o teste de confiabilidade não paramétrico de “*bootstrap*” com 2000 réplicas.

**Quadro 5** - Rotavírus utilizados para comparação neste estudo.

<b>Amostra</b>	<b>Obtido</b>	<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Número de acesso</b>
Ch-1	Frango	Irlanda	1979	AB065287
Ty-1	Peru	Irlanda	1979	AB065285
PO-13	Pombo	Japão	1983	AB009627
02V0002G3	Frango	Alemanha	2002	FJ169862
NC/SEP-839	Frango	E.U.A	2005	EU400310
AR/SEP-840	Frango	E.U.A	2005	EU400302
NC/SEP-833	Peru	E.U.A	2005	EU400315
MN-SEP-808	Peru	E.U.A	2005	EU400311
05V0049	Frango	Alemanha	2005	GU733452
USP336-13	Frango	Brasil	2010	JF309130

**Quadro 6 - Picobirnavírus utilizados para comparação neste estudo.**

<b>Amostra</b>	<b>Obtido</b>	<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Número de acesso</b>
104-FL-97	Humano	E.U.A	1997	AF246938
P597	Humano	Índia	nd	AB193349
1-CHN-97	Humano	China	1997	AF246939
4-GA-91	Humano	E.U.A	1991	AF246940
MD-2010	Peru	E.U.A	nd	HM803965
D6	Suíno	Hungria	2005	AM706375
D4	Suíno	Hungria	2005	AM706372
Dog/BR-01	Canino	Brasil	2004	EU814970
RUBV-P	Bovino	Índia	2005	GQ221268
Snake/BR-01	Cobra	Brasil	2006	EU814971
Rat/BR-01	Murino	Brasil	2006	EU814972
VS137	Humano	Holanda	2007	GU968944
VS111	Humano	Holanda	2007	GU968942
GPBV3	Humano	Índia	2007	AB478502
Washington Raw Sewage2	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938900
Washington Raw Sewage10	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938908
Louisiana Raw Sewage6	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938815
Louisiana Raw Sewage11	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938820
Oregon Raw Sewage7	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938890
New Jersey Raw Sewage6	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938877
New Jersey Raw Sewage12	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938883
California Raw Sewage6	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938727
Florida Keys Raw Sewage38	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938809
Maryland Raw Sewage38	Amostra ambiental (esgoto)	E.U.A	2007	EU938850
BG-Eq-3	Equino	Índia	2010	AB598401

nd - não disponível.

**Quadro 7** - Reovírus utilizados para comparação neste estudo.

<b>Amostra</b>	<b>Obtido</b>	<b>País</b>	<b>Ano</b>	<b>Número de acesso</b>
S1133	Frango	E.U.A	1975	AF104311
OS161	Frango	Japão	1970	AF294770
Muntrilj06	Peru	Croácia	2007	FJ606766
Ost1	Avestruz	Japão	nd	AB435371
S14	Pato	China	1997	AY962259
G040	Ganso	China	2004	AY962262
Lang	Mamífero	nd	nd	L19774
Baboon Reovirus	Babuíno	nd	nd	AF059719

nd - não disponível.

### 5.6.7 Análise estatística

A presença ou ausência do agente é definida como uma variável do tipo categórica, ou seja, mensurada sob a forma de categorias do tipo positivo e negativo (Sampaio, 1998). Para as análises estatísticas dos dados amostrais coletados, foi utilizado o programa MiniTab 14 (Minitab®Statistical Software).

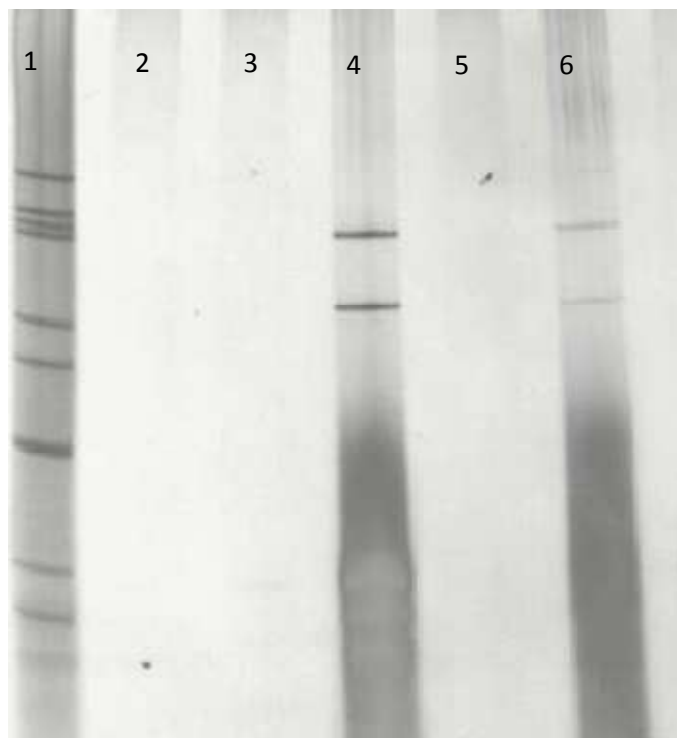
As amostras provenientes de diferentes municípios, idades, integradoras, densidades de alojamento e estação do ano foram testadas sob-hipótese de nulidade de que a presença e ausência do agente independem destas variáveis. Para tal, foi aplicado o teste Exato de Fisher adotando o nível alfa 5% para detectar diferenças estatisticamente significantes.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 EGPA

A análise das 85 amostras fecais para RVA não demonstrou amostras com perfil eletroforético condizente com RVA-A. No caso do PBV, 13/85 (15,3%) amostras apresentaram os dois segmentos genômicos característicos do PBV com perfil eletroforético longo (Fig. 20). Para o ARV, apenas 01/85 (1,2%) amostra apresentou resultado positivo a EGPA, não sendo possível a captação desta pelo sistema de foto documentação; entretanto, a mesma apresentou perfil eletroforético compatível com ARV. Todos os resultados positivos para EGPA foram confirmados pela RT-PCR.

**Figura 20** - EGPA para PBV demonstrando as amostras positivas.



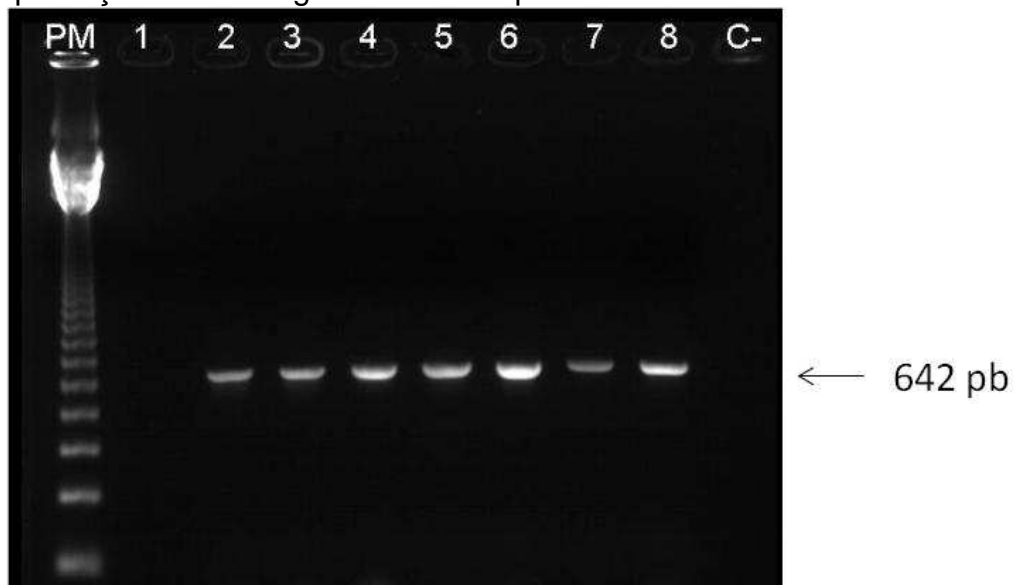
Coluna 1 = protótipo de rotavírus símio (SA11) usado como controle positivo; Colunas 4 e 6 – Amostras positivas para o PBV.



## 6.2 RT-PCR

De um total de 85 amostras fecais testadas, 35 (41,2%) foram positivas para RVA (Fig. 21).

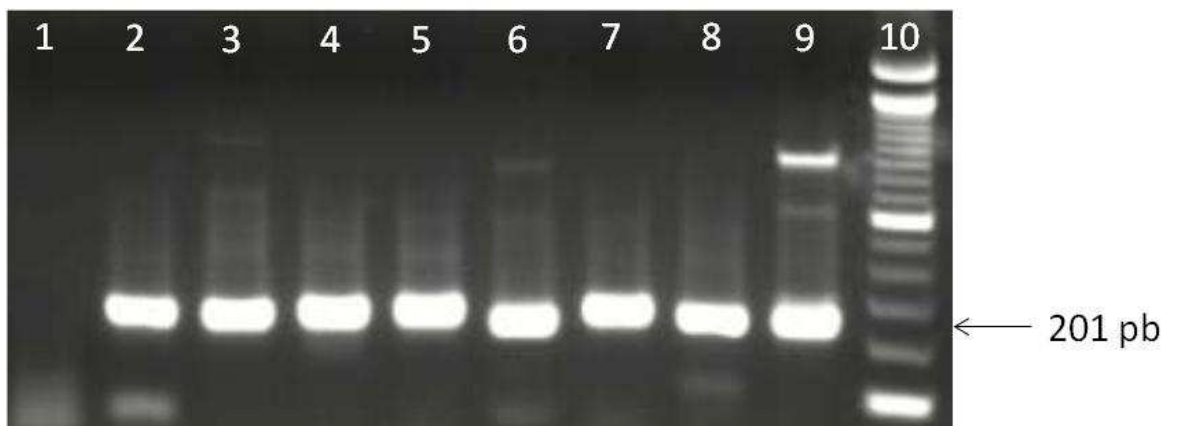
**Figura 21** - Amostras positivas para o gene que codifica a proteína NSP4 do RVA com amplificação de um fragmento de 642 pb.



PM = peso molecular de 123 pb; Colunas 2 a 7 – Amostras positivas para o gene NSP4; C- = controle negativo; Coluna 8 = amostra de RVA obtida neste estudo e confirmada por sequenciamento, utilizada como controle positivo.

Para PBV, de um total de 85 amostras fecais testadas, 42 (49,4%) foram positivas (Fig. 22).

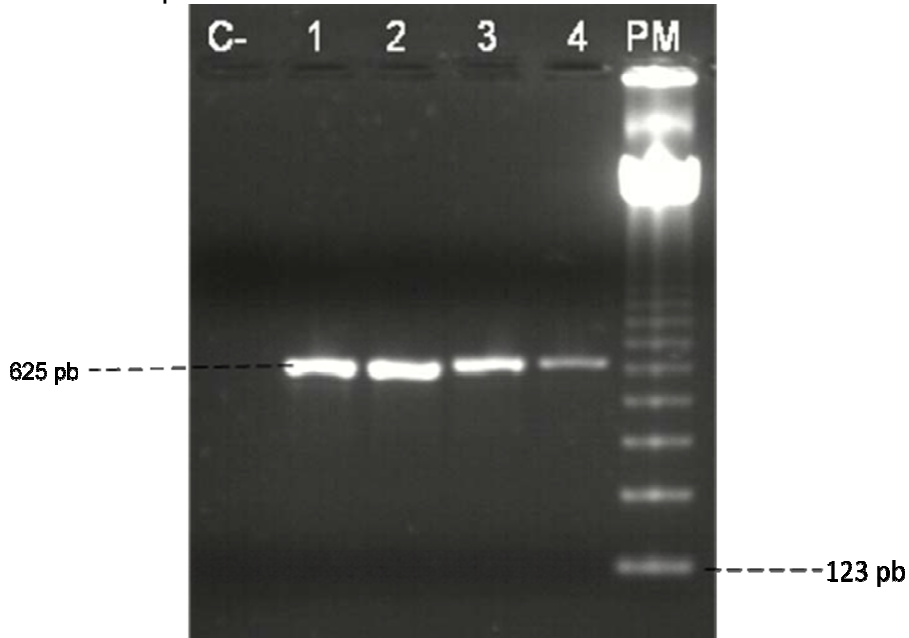
**Figura 22** - Amostras positivas para o gene RdRp do PBV genogrupo I com amplificação de um fragmento de 201 pb.



Coluna 10 = peso molecular de 100 pb; Colunas 3 a 9 – Amostras positivas para o gene RdRp e Coluna 1 = controle negativo; Coluna 2 = amostra de PBV obtida neste estudo e confirmada por sequenciamento, utilizada como controle positivo.

No caso do ARV, de um total de 85 amostras fecais testadas, 28 (32,9%) foram positivas (Fig. 23).

**Figura 23** - Amostras positivas para o gene S2 de Reovírus com amplificação de um fragmento de 625 pb.



PM = peso molecular de 123 pb; Colunas 2 a 4 – Amostras positivas para o gene S2 e C- = controle negativo; Coluna 1 = amostra de ARV obtida neste estudo e confirmada por sequenciamento, utilizada como controle positivo.

Das 37 granjas estudadas, 19 (51,4%) apresentaram no mínimo um galpão com a presença do RVA. Em seis (75%) dos oito municípios amostrados ocorreu a presença do RVA. As maiores prevalências para RVA foram encontradas em Belém, Santa Bárbara e Santa Isabel. Prevalências intermediárias foram encontradas em Benevides, Inhangapi e Castanhal. Não houve detecção do RVA em Ananindeua e Santo Antônio do Tauá (Tabela 5). Diferenças significativas foram observadas entre Santa Isabel e Castanhal ( $p \leq 0,05$ ), Santa Isabel e Ananindeua ( $p \leq 0,01$ ), Santa Isabel e Santo Antônio do Tauá ( $p \leq 0,05$ ), Castanhal e Belém ( $p \leq 0,05$ ), Ananindeua e Belém ( $p \leq 0,01$ ), Ananindeua e Santa Bárbara ( $p \leq 0,05$ ), Belém e Santo Antônio do Tauá ( $p \leq 0,05$ ) e Santa Bárbara e Santo Antônio do Tauá ( $p \leq 0,05$ ).

Para PBV, das 37 granjas estudadas, 21 (56,8%) apresentaram no mínimo um galpão com a presença do PBV. Em sete (87,5%) dos oito municípios amostrados ocorreu a presença do PBV. As maiores prevalências para PBV foram encontradas em Santa Bárbara, Benevides, Castanhal, Inhangapi e Belém.

Prevalências intermediárias foram encontradas em Santa Isabel e Santo Antônio do Tauá. Não houve detecção do PBV em Ananindeua (Tabela 5). Diferenças significativas foram observadas entre Santa Isabel e Benevides ( $p \leq 0,05$ ), Santa Isabel e Castanhal ( $p \leq 0,05$ ), Ananindeua e Benevides ( $p \leq 0,01$ ), Ananindeua e Castanhal ( $p \leq 0,01$ ), Ananindeua e Inhangapi ( $p \leq 0,05$ ), Ananindeua e Belém ( $p \leq 0,05$ ) e Ananindeua e Santa Bárbara ( $p \leq 0,05$ ).

No caso dos ARV, das 37 granjas estudadas, 19 (51,4%) apresentaram no mínimo um galpão com a presença do ARV. Em seis (75%) dos oito municípios amostrados ocorreu a presença do ARV. As maiores prevalências para ARV foram encontradas em Castanhal, Inhangapi e Belém. Prevalências intermediárias foram encontradas em Benevides, Santa Isabel e Ananindeua. Não houve detecção do ARV em Santo Antônio do Tauá e Santa Bárbara (Tabela 5). Não foram observadas diferenças significativas entre os municípios ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5** - Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte de oito municípios da Mesorregião Metropolitana de Belém.

Municípios	Amostras colhidas	RVA	PBV	ARV
		PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>
Belém	5	4 (80%)	3 (60%)	2 (40%)
Santa Bárbara	4	3 (75%)	3 (75%)	0 (0%)
Santa Isabel	34	20 (58,8%)	12 (35,3%)	11 (32,4%)
Benevides	12	4 (33,3%)	9 (75%)	4 (33,3%)
Inhangapi	7	2 (28,6%)	5 (71,4%)	3 (42,9%)
Castanhal	12	2 (16,6%)	9 (75%)	6 (50%)
Ananindeua	7	0 (0%)	0 (0%)	2 (28,6%)
Santo Antônio Tauá	4	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
Total	85	35 (41, 2%)	42 (49,4%)	28 (32,9%)

Todas as faixas etárias foram positivas para RVA. A maior frequência de amostras positivas para RVA (48,6%) ocorreu em frangos entre 31-45 dias (Tabela 6). Diferenças significativas foram observadas entre frangos de 1-15 e 16-30 dias ( $p \leq 0,05$ ) e 1-15 e 31-45 dias ( $p \leq 0,05$ ), e não foi observada diferença significativa entre 16-30 e 31-45 dias ( $p > 0,05$ ).

Somente as faixas etárias de 16-30 e 31-45 dias foram positivas para o PBV. A maior frequência de amostras positivas para PBV (78,4%) ocorreu em frangos entre 31-45 dias (Tabela 6). Diferenças significativas foram observadas entre 1-15 e 16-30 dias ( $p \leq 0,01$ ) e 16-30 e 31-45 dias ( $p \leq 0,01$ ), e não foi observada diferença significativa entre 1-15 e 31-45 dias ( $p > 0,05$ ).

Para os ARV, a maior frequência de amostras positivas (37,8%) ocorreu em frangos entre 16-30 dias (Tabela 6). Não foram observadas diferenças significativas entre 1-15 e 16-30 dias ( $p > 0,05$ ) e 1-15 e 31-45 dias ( $p > 0,05$ ) e 16-30 e 31-45 dias ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 6** - Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte de diferentes idades.

Idade	Amostras colhidas	RVA	PBV	ARV
		PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>
1-15 dias	11	1 (9,1%)	0 (0%)	1 (9,1%)
16-30 dias	37	16 (43,2%)	13 (35,1%)	14 (37,8%)
31-45 dias	37	18 (48,6%)	29 (78,4%)	13 (35,1%)
Total	85	35 (41,2%)	42 (49,4%)	28 (32,9%)

Todas as densidades populacionais foram positivas para RVA. Os frangos alojados sob densidade  $>9$  aves/m<sup>2</sup> apresentaram maior frequência de positividade (48,1%) em relação aos sob  $\leq 9$  aves/m<sup>2</sup> (Tabela 7). Diferenças significativas foram observadas entre  $\leq 9$  aves/m<sup>2</sup> e  $>9$  aves/m<sup>2</sup> ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação aos PBV os frangos alojados sob densidade  $>9$  aves/m<sup>2</sup> apresentaram maior frequência de positividade (57,7%) em relação aos sob  $\leq 9$  aves/m<sup>2</sup> (Tabela 7). Não foram observadas diferenças significativas entre  $\leq 9$  aves/m<sup>2</sup> e  $>9$  aves/m<sup>2</sup> ( $p > 0,05$ ).

No que diz respeito aos ARV, os frangos alojados sob densidade  $>9$  aves/m<sup>2</sup> apresentaram maior frequência de positividade (30,8%) em relação aos sob  $\leq 9$  aves/m<sup>2</sup> (Tabela 7). Da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas entre  $\leq 9$  aves/m<sup>2</sup> e  $>9$  aves/m<sup>2</sup> ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 7** - Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte submetidos a diferentes densidades populacionais.

Densidade	Amostras colhidas	RVA	PBV	ARV
		PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>
$\leq 9,0$ aves m <sup>2</sup>	20	4 (20%)	8 (40%)	5 (25%)
$>9$ aves m <sup>2</sup>	52	25 (48,1%)	30 (57,7%)	16 (30,8%)
Total	72*	29 (40,3%)	38 (52,8%)	21 (29,2%)

\* Em 13 amostras provenientes de cinco granjas não foi possível a obtenção de informação quanto a densidade populacional.

Duas (66,7%) das três integradoras apresentaram granjas com a presença do RVA (Tabela 8). Não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências observadas entre as integradoras ( $p > 0,05$ ) estudadas.

Todas as integradoras apresentaram granjas com a presença do PBV (Tabela 8). Não se observou diferença estatisticamente significativa nas frequências observadas entre as integradoras ( $p > 0,05$ ).

Com relação aos ARV, duas (66,7%) das três integradoras apresentaram granjas com positividade para o referido agente, não se registrando diferença estatisticamente significativa nas frequências (Tabela 8).

**Tabela 8** - Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte das diferentes integradoras.

Integradora	Amostras colhidas	RVA	PBV	ARV
		PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>
Integradora 1	39	14 (35,9%)	25 (64,1%)	14 (35,9%)
Integradora 2	38	19 (50%)	15 (39,5%)	14 (36,8%)
Integradora 3	4	0 (0%)	1 (25%)	0 (0%)
Total	81*	33 (40,7%)	41 (50,6%)	28 (34,6%)

\* Quatro amostras pertenciam a granjas sem integradoras.

Foi observada a circulação do RVA em todas as estações do ano estudadas (Tabela 9). Não houve diferença estatisticamente significativa nas frequências observadas entre as estações estudadas ( $p>0,05$ ).

O PBV e o ARV foram detectados em todas as estações do ano, não havendo diferença estatisticamente significativa nas frequências observadas entre as estações estudadas (Tabela 9).

**Tabela 9** - Detecção de RVA, PBV e ARV por RT-PCR em frangos de corte nas diferentes estações.

Estação	Amostras colhidas	RVA	PBV	ARV
		PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>
Inverno Amazônico	38	17 (44,7%)	22 (57,9%)	9 (23,7%)
Verão Amazônico	47	18 (38,3%)	20 (42,6%)	19 (40,4%)
Total	85	35 (41,2%)	42 (49,4%)	28 (32,9%)

Das 85 amostras testadas, 63 (74,1%) foram positivas para um ou mais vírus testados (Tabela 10). Das amostras positivas, 30 (47,6%) foram positivas para um único vírus; 12 para RVA, 13 para PBV e cinco amostras para ARV. Nas 33 (52,4%) amostras restantes, uma combinação de viroses foi encontrada, com a combinação PBV-ARV sendo a mais predominante. Oito amostras foram positivas para todos os três vírus.

**Tabela 10** - Detecção das viroses entéricas por RT-PCR sozinhas ou em combinação.

Patógeno (s)	Número de amostras fecais positivas para as viroses indicadas*
Somente RVA	12 (19%)
Somente PBV	13 (20,6%)
Somente ARV	05 (7,9%)
RVA+PBV	10 (15,9%)
RVA+ARV	04 (6,3%)
PBV+ARV	11 (17,5%)
RVA+PBV+ARV	08 (12,7%)
Total	63 (74,1%)

\* Um total de 85 amostras foi examinado.

## 6.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

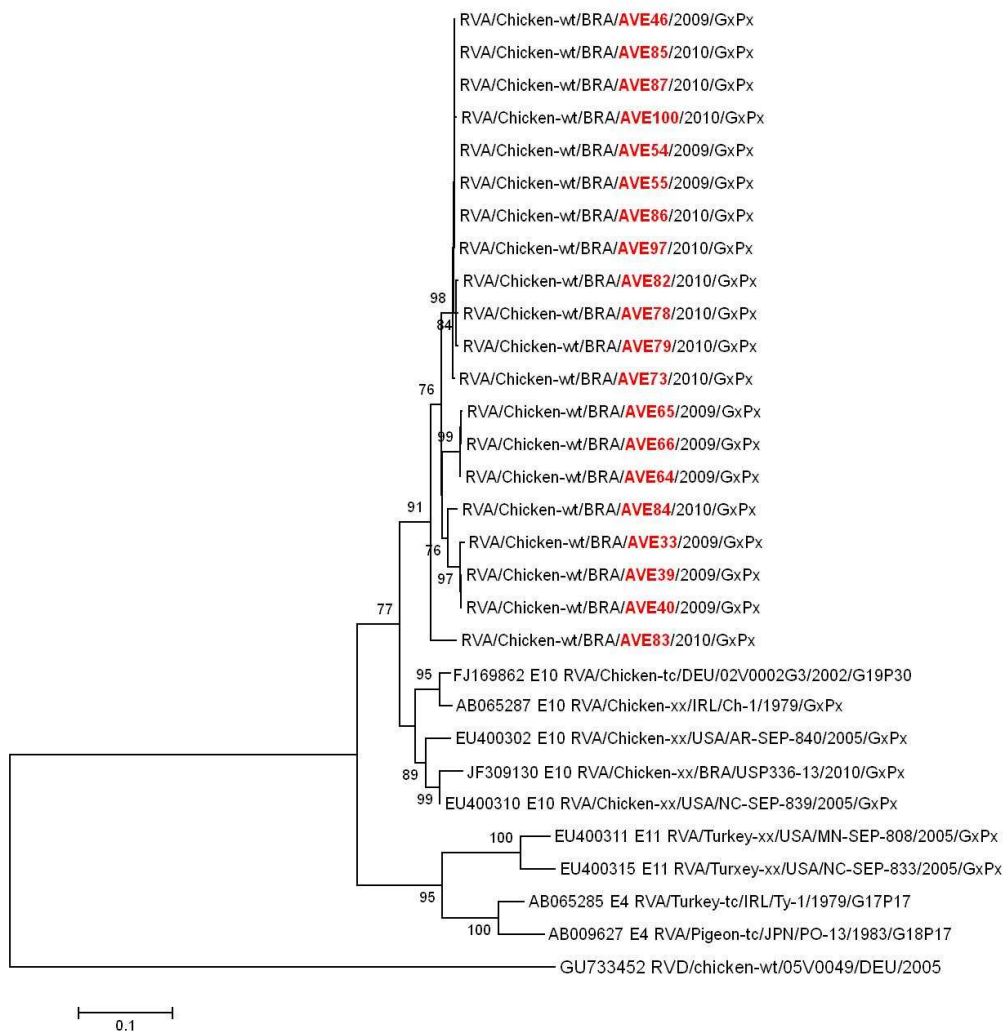
### 6.3.1 Rotavírus

Os fragmentos parciais do gene NSP4 provenientes dos produtos de PCR de 20 amostras positivas para o RVA foram sequenciados e comparados com sequências previamente publicadas. Desta forma, as análises incluíram fragmentos de 632 nucleotídeos (nt), os quais corresponderam aos nt 35-666 do gene NSP4, usando a sequência total do protótipo 02V0002G3 como referência (número de acesso: FJ169862). Os RVA deste estudo foram mais relacionados aos RVA

reportados na Alemanha (02V0002G3), Reino Unido (Ch-1), E.U.A (AR/SEP-840; NC/SEP-839) e Brasil (USP336-13). Muito embora as amostras deste estudo tenham ficado em um grupo separado, o valor de *bootstrap* (77%) é indicativo de sua classificação dentro do genotipo E10 (Fig. 24), o qual, até o momento, foi descrito somente em frangos.

Das 20 sequências obtidas, 19 foram mais similares entre si, enquanto a amostra AVE83/2010 foi mais divergente (Fig. 24).

**Figura 24** - Árvore filogenética construída usando as sequências do gene NSP4 do RVA amplificados de 20 amostras de *pool* fecal de aves.



Sequências começando em "AVE" são do presente estudo. A árvore filogenética foi construída pelo método de neighbour-joining e Kimura dois parâmetros. Os valores de *bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore. Valores menores que 70% não estão representados. A barra de escala é proporcional à distância filogenética. O protótipo de RVA-D (05V0049) foi incluído como grupo externo para melhor entendimento dos relacionamentos genéticos entre as cepas. Chicken=Frango; Turkey=Peru; Pigeon=Pombo. BRA=Brasil; DEU=Alemanha; IRL=Irlanda; USA=Estados Unidos e JPN=Japão.



O gene NSP4 dos RVA da mesorregião metropolitana de Belém apresentaram entre 93,5 e 100% de similaridade entre elas ao nível de nt e entre 93,4 e 100% ao nível de aa. Comparações com sequências de RVA obtidas em frangos anteriormente publicadas demonstraram um similaridade entre 86,3 e 90,5% ao nível de nt e entre 83,2 e 91,8% ao nível de aa. Quando os RVA deste estudo foram comparados com os RVA obtidos em perus previamente publicados, a similaridade de sequência ao nível de nt ficou entre 67,2 e 73% e entre 73,1 e 78,3% ao nível de aa. Esses valores foram similares aos observados quando da comparação entre as sequências dos protótipos de frango (genótipo E10) e peru (genótipo 11) (67,6-72,4% nt e 72,2-78,8% aa).

A análise da sequência de aa correspondendo as posições 1 a 169 da proteína NSP4 da amostra 02V0002G3, revelou algumas substituições características nas amostras da mesorregião metropolitana, como pode ser visto nos resíduos M18I, I43L, R51S, V97I/M, N142T, E146G, T147I, E153D, e S156N (Fig. 25). Ao analisar especificamente o domínio de atividade enterotoxigênica (aa 109-135), as amostras deste estudo apresentaram-se conservadas nesta região e bastante similares ao protótipo PO-13, com exceção no resíduo 133 (M→L).



No final, foram obtidas 64 sequências, mas apenas 34 foram analisadas (Quadro 8), pois para tal foram retiradas as sequências que apresentaram 100% de similaridade nucleotídica e aquelas com baixa qualidade.

**Quadro 8** - Esquema de utilização dos clones na árvore filogenética de acordo com a identidade nucleotídica que apresentaram.

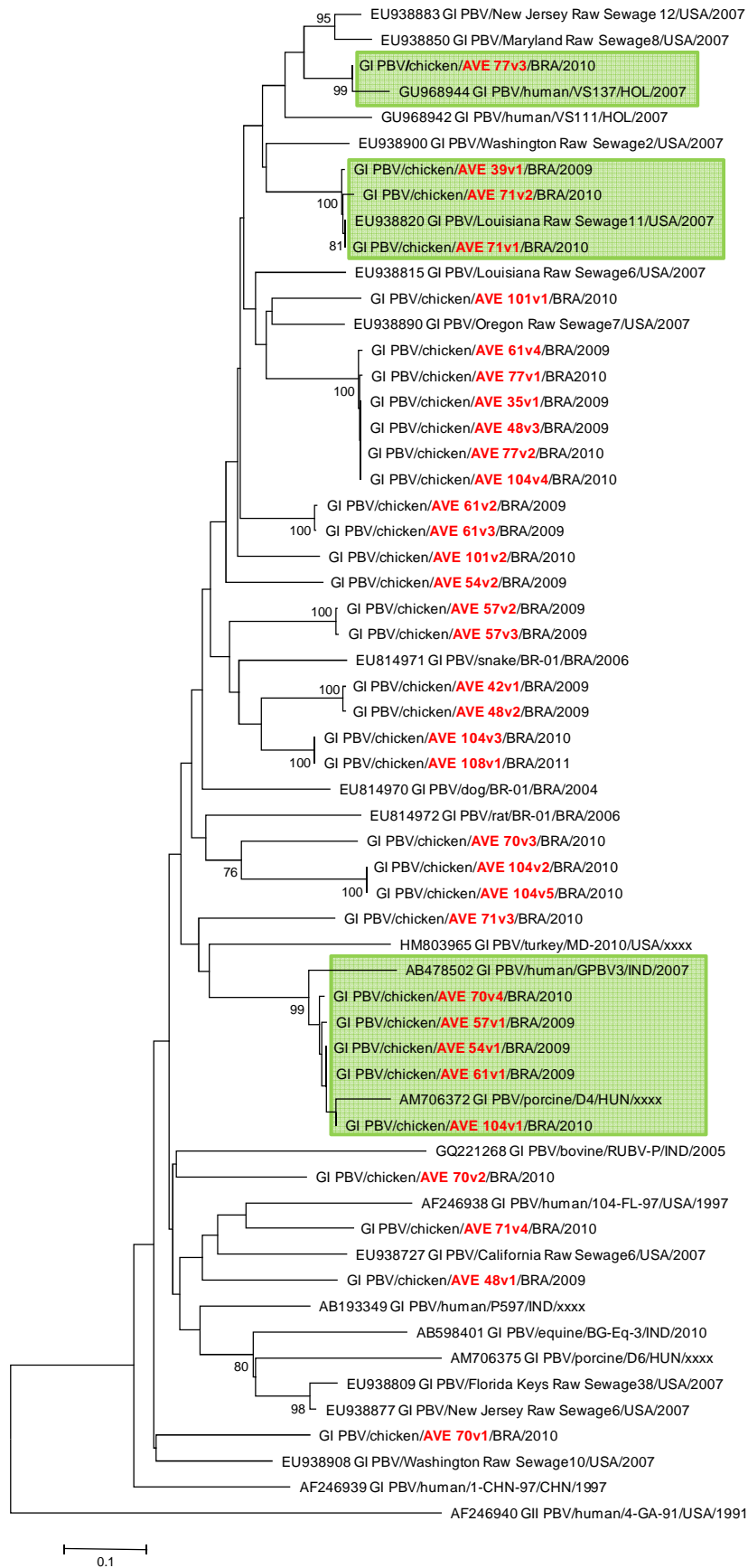
<b>Amostra Original</b>	<b>Clones Produzidos</b>	<b>Sequências utilizadas na Árvore Filogenética</b>
AVE 35	AVE 35 c1; AVE 35 c2; AVE 35 c3; AVE 35 c4; AVE 35 c5	AVE 35 v1
AVE 39	AVE 39 c1; AVE 39 c2; AVE 39 c3; AVE 39 c4; AVE 39 c5	AVE 39 v1
AVE 42	AVE 42 c1; AVE 42 c2; AVE 42; c3; AVE 42 c4; AVE 42 c5	AVE 42 v1
AVE 48	AVE 48 c1; AVE 48 c2; AVE 48 c3; AVE 48 c4; AVE 48 c5	AVE 48 v1; AVE 48 v2; AVE 48 v3
AVE 54	AVE 54 c1; AVE 54 c2; AVE 54 c3; AVE 54 c4	AVE 54 v1; AVE 54 v2
AVE 57	AVE 57 c1; AVE 57 c2; AVE 57 c3; AVE 57 c4; AVE 57 c5	AVE 57 v1; AVE 57 v2; AVE 57 v3
AVE 61	AVE 61 c1; AVE 61 c2; AVE 61 c3; AVE 61 c4; AVE 61 c5	AVE 61 v1; AVE 61 v2; AVE 61 v3; AVE 61 v4
AVE 70	AVE 70 c1; AVE 70 c2; AVE 70 c3; AVE 70 c4; AVE 70 c5	AVE 70 v1; AVE 70 v2; AVE 70 v3; AVE 70 v4
AVE 71	AVE 71 c1; AVE 71 c2; AVE 71 c3; AVE 71 c4; AVE 71 c5	AVE 71 v1; AVE 71 v2; AVE 71 v3; AVE 71 v4
AVE 77	AVE 77 c1; AVE 77 c2; AVE 77 c3; AVE 77 c4; AVE 77 c5	AVE 77 v1; AVE 77 v2; AVE 77 v3
AVE 101	AVE 101 c1; AVE 101 c2; AVE 101 c3; AVE 101 c4; AVE 101 c5	AVE 101 v1; AVE 101 v2
AVE 104	AVE 104 c1; AVE 104 c2; AVE 104 c3; AVE 104 c4; AVE 104 c5	AVE 104 v1; AVE 104 v2; AVE 104 v3; AVE 104 v4; AVE 104 v5
AVE 108	AVE 108 c1; AVE 108 c2; AVE 108 c3; AVE 108 c4; AVE 108 c5	AVE 108 v1

Entre as 34 variantes obtidas ocorreram à formação de diversos grupos de sequências mais relacionadas, embora, não obedecendo a um padrão de distribuição regional ou agrupamento por espécie. As diversas variantes de PBV

deste estudo relacionaram-se de forma heterogênea com outros PBV reportados em distintas partes do mundo e obtidos em diferentes materiais e/ou espécies (Fig. 26).

Observou-se uma grande diversidade entre as variantes deste estudo e, entre estas e os protótipos utilizados. Esta diversidade foi corroborada pelos baixos valores de *bootstrap* (menores que 70%) não informados na árvore. Assim, poucas variantes puderam ser relacionadas especificamente a um protótipo (Fig. 26, quadros em verde).

**Figura 26** - Árvore filogenética das sequências nucleotídicas dos fragmentos clonados do gene RdRp do PBV.



Sequências começando em “AVE” são do presente estudo. A árvore filogenética foi construída pelo método de neighbour-joining. Os valores de *bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore, valores menores que 70% não estão representados. A barra de escala é proporcional a distância filogenética. O protótipo de PBV do genogrupo II (4-GA-91) foi incluído como grupo externo para melhor entendimento dos relacionamentos genéticos entre as cepas. Chicken=Frango; Turkey=Peru; Pigeon=Pombo; Raw Sewage=Água de esgoto; Human=Humano; Snake=Cobra; Dog=Canino; Rat=Rato; Porcine=Suíno; Bovine=Bovino; Equine=Equino. BRA=Brasil; CHN=China; HOL=Holanda; HUN=Hungria; IND=Índia; USA=Estados Unidos e JPN=Japão.

As variantes de PBV do presente estudo apresentaram similaridade nucleotídica variando entre 50,3 e 100%, enquanto que ao nível de aa esses valores foram de 62,1 e 100%. Para as variantes que agruparam especificamente com os protótipos inclusos nas análises, esses valores estão apresentados na tabela 11.

**Tabela 11** – Valores de similaridade aos níveis de nt e aa observados entre variantes identificadas neste estudo e sequências protótipo, considerando agrupamentos que apresentaram valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 99%.

Variantes	Protótipos	Similaridade nt	Similaridade aa
AVE 77v3	VS 137	97%	98,2%
AVE 39v1, 71v1, 71v2	Louisiana Raw Sewage11	98,5-100%	98,5-100%
AVE 54v1, 57v1, 61v1, 70v4, 104v1	GPBV3 D4	85,4-95%	89,3-98,2%

Para as demais variantes de PBV detectadas na mesorregião metropolitana de Belém, tais valores de similaridade nucleotídica e aminoacídica, quando comparadas com todos os protótipos analisados, foram 56,7-84,1% e 56,1-87,9%, respectivamente.

De forma geral, as variantes deste estudo foram mais relacionadas entre si do que com os protótipos utilizados para comparação.

A análise da sequência de aa abrangeu os resíduos 204 a 269 da proteína RdRp da amostra RUBV-P e revelou diversas substituições nas amostras da mesorregião metropolitana de Belém (Fig. 27). Apesar da ampla diversidade aminoacídica entre as amostras de PBV analisadas, tanto as colhidas neste estudo quanto os protótipos, pôde ser observado que o domínio D-S/T-D (aa 262-267) manteve-se conservado em todas as sequências.

Figura 27 - Alinhamento das variantes genômicas detectadas neste estudo em comparação com o protótipo Bovine/RUBV-P.

	213	223	233	243	253	263	268
Bovine/RUBV-P	VWMFPPFGVNI	AELSVYQPLIERCQ	DKNLIAPWIGLSAVD	RRITQLFETKRPEDYVIC	TD	TKFDQH	
AVE 104v1	.....A.....	RL.....T..RF..VPA.VSMES.....	RM.D.D.K.DI.....	S.....			
AVE 61v1	.....A.....	RL.....T..RF..VPA.VSMES.....	RM.D.D.K.DI.....	S.....			
AVE 54v1	.....A.....	RL.....T..RF..VPA.VSMES.....	RM.D.D.K.DI.....	S.....			
AVE 57v1	.....A.....	RL.....T..RF..VPA.VSMES.....	RM.D.D.K.DI.....	S.....			
AVE 70v4	.....A.....	RL.....T..RF..VPA.VSMES.....	RM.D.D.K.DI.....	S.....			
Porcine/D4	?????.A.....	RL.....T..RF..VPA.VSMES..Q.....	RM.D.D.K.DI.....	S??????			
Human/GPBV3	?????.A.....	G..RL.....T..RFD.VPA.VSMDS..Q.....	RM.D.D.T.DIV.....	S??????			
AVE 54v2	.....LA..R..Q.....	SA.RF..VPA.VSMES.....	D..DS.SDD.L.V.....	S.....			
AVE 70v3	.....MAL..S..Q.....	G..KH..VPA.VSMES..KN..SM.D..DDD.L.V.....	S.....				
AVE 104v2	.....LV.HM.....	SM.HT..VPA.V.MES..KE..H..D..SDD.L.V.....	S.....				
AVE 104v5	.....LV.HM.....	SM.HT..VPA.V.MES..KE..H..D..SDD.L.V.....	S.....				
AVE 101v1	.....YA..Q..R.....	AA.NQR.VPA.VSMEL..HV.EM.D..SDD.LIV.....	S.....				
AVE 101v2	.....YA..Q..R.....	AA.KF..VPA.VSMES..KAV.R..D..SSD.L.V.....	S.....				
AVE 61v2	.....A..E..R.....	AA.KFD.VPA.VSMDS.....	EM.D..SAD.L.V.....	S.....			
AVE 61v3	.....A..E..R.....	AA.KFD.VPA.VSMDS.....	EM.D..SAD.L.V.....	S.....			
AVE 61v4	.....A..LQ..R.....	GA.KSR.VPA.VSMDE.....	DM.D..SSD.L.....	S.....			
AVE 77v1	.....A..LQ..R.....	GA.KSR.VPA.VSMDE.....	DM.D..SSD.L.....	S.....			
AVE 35v1	.....A..LQ..R.....	GA.KSR.VPA.VSMDE.....	DM.D..SSD.L.....	S.....			
AVE 48v3	.....A..LQ..R.....	GA.KSR.VPA.VSMDE.....	DM.D..SSD.L.....	S.....			
AVE 77v2	.....A..LQ..R.....	GA.KSR.VPA.VSMDE.....	DM.D..SSD.L.....	S.....			
AVE 104v4	.....A..LQ..R.....	GA.KSR.VPA.VSMDE.....	DM.D..SSD.L.....	S.....			
AVE 77v3	.....YA.....Q.....	F..AA.RF.IVPA.VSFDE..K..AM.D..ASD.L.V.....	S.....				
Human/VS137	?????YA.....	Q.....F..AA.KF.IVPA.VSFDE..K..AM.D..ASD.L.V.....	S??????				
N.J RawSewage12	.....YA.....QL..F..AA.RH.VVPA.VSFDE..K..AM.D..ADN.L.V.....	S.....					
MarylRawSewage8	.....YA.....QL..F..AA.RH.I.PA.VSFDE..K..AM.D..ASN.L.V.....	S.....					
AVE 71v2	.....YA.....QL..F..AV.KF.V.PA.VSMD..K..DM.D..SDS.L.V.....	S.....					
AVE 39v1	.....YA.....QL..F..AA.KF.V.PA.VSMD..K..DM.D..SDS.L.V.....	S.....					
AVE 71v1	.....YA.....QL..F..AA.KF.V.PA.VSMD..K..DM.D..SDS.L.V.....	S.....					
Louis.RawSewage1	.....YA.....QL..F..AA.KF.V.PA.VSMD..K..DM.D..SDS.L.V.....	S.....					
AVE 71v4	.....VR..Q.....AAA.RG..VPA.V.MDS..KAV.K..D..S.K.LI.....	S.....					
AVE 48v1	.....A..VK..QL.....AF.HF.YVPA.V.TD..LAV.KM.DS.AAD.L.....	S.....					
AVE 42v1	.....A..R..Q.....T..AA.KFG..PA.VSME..KTV.R..D..SDN.L.V.....	S.....					
AVE 48v2	.....A..R..Q.....T..AA.KFG..PA.VSME..KTV.R..D..DN.L.V.....	S.....					
AVE 104v3	.....A..K..Q.....AA.KF..VPA.VSMD..KK..D..D..SDS.L.V.....	S.....					
AVE 108v1	.....A..K..Q.....AA.KF..VPA.VSMD..KK..D..D..SDS.L.V.....	S.....					
AVE 57v2	.....A..K..Q.....AA.KF..VPS..SMDE..KV..K..D..SKN.LIV.....	S.....					
AVE 57v3	.....A..K..Q.....AA.KF..VPS..SMDE..KV..K..D..SKN.LIV.....	S.....					
AVE 70v2	.....YAI..Q..I.....AA.NF..VPA.VSMEQ..EV.....D..GKN.SI.....	S.....					
AVE 70v1	.....I..E..RF..A..VA.QLQ.VPA.VSMD..A..K..D..GSR.LIV.....	S.....					
AVE 71v3	.....A..E..RL..A..LA.RH..VPA..ME..KS.....D..GKN.L.V.....	S.....					
Human/P597	.....A..Q..RL.....S..KF..VPA.VSMES..KC..K..D..SAD.DI.....	S.....					
Equine/BG-Eq-3	?????.S..N..Q.....S..KFD.VPA.VSMES..Q..MM.D..AKD.V.....	S??????					
Porcine/D6	?????.A..R..Q.....L..RFE.VPA.VSMES.....KM.D..AKD.LA.....	S??????					
F.K RawSewage38	.....S..R..QM.....S..RF..VPA.VSME.....DM.D..GEN.L.....	S.....					
N.J RawSewage6	.....A..R..QM.....S..RF..VPA.VSME.....DM.D..GEN.L.....	S.....					
Wash. RawSewage10	.....A..E..RY..A..AA.NF..VPA.VSMES..D..RM.D..GSD.L.....	S.....					
Snake/BR-01	.....A.....Q.....M..AA.RFD.VPA.V.MES.....K..DN.SSD.L.V??????????	S??????					
Human/VS111	?????YA..E..R.....AA.RF..VPA.VSMD..K..AM.D..ADD.L.V.....	S??????					
Oreg. RawSewage7	.....YA..E..R.....AA.RFR.VPA.VSMDE.....RM.D..DD.LIV.....	S.....					
Wash.RawSewage2	.....YA..R..QL.....A..RFD.VPA.V.MD..K..DM.D..SDS.L.V.....	S.....					
Human/104-FL-97	?????YA..K..Q.....AAF.KH..VPA.VSMDE..TV.R..D..GSN.LI.....	E??????					
Louis.RawSewage6	.....YA..E.....KV.SF..VPA.VSMES.....AM.D..ASN.L.V.....	S.....					
Calif.RawSewage6	.....YA..Q..Q.....AF.YH..VPA.V.MD..VEV.R..D..S.L.....	S.....					
Dog/BR-01	.....YA..E..R.....AA.KF.YVPS.VSMD..K..D..D..GDNPI.....	S.....					
Rat/BR-01	.....YA.....Q.....AA.NTR..PS.VSMDE..A..Y..D..GRD.LI.....	??					
Human/1-CHN-97	.....VK..QF..A..IA.KRWITPA..ME..Q..K..D..AKSEL.....	S.....					
Turkey/MD-2010	.....S..AQ..R.....AA.RHGIVPA..SMD..M..NM.D..GAN.D.....	S.....					

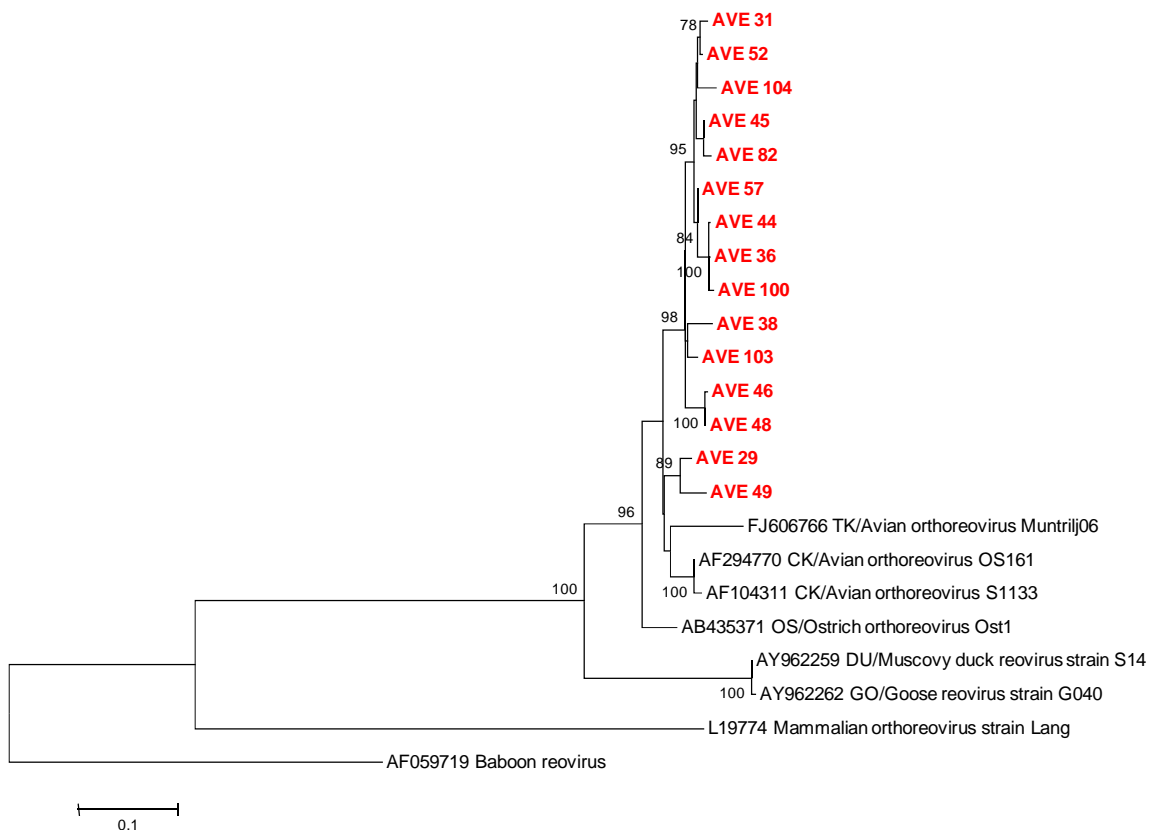
Os números no topo demonstram a posição do aa na sequência. Um ponto indica identidade de aa em comparação com a sequência referência naquela posição e (?) indica sequência não determinada. As linhas horizontais demarcam os vários perfis aminoacídicos encontrados entre as amostras da mesorregião metropolitana de Belém. A região do domínio D-S/T-D (aa 262-267) conservada entre as amostras está em destaque.

### 6.3.3 Reovírus

Os fragmentos parciais do gene S2 provenientes dos produtos de PCR de 15 amostras positivas para o ARV foram sequenciados e comparados com sequências previamente publicadas. As análises incluíram fragmentos de 627 nt, os quais corresponderam aos nt 20-646 do gene S2, usando a sequência da região codificadora do protótipo OS161 (Número de acesso: AF294770) como referência.

Os ARV deste estudo foram mais relacionados aos ARV obtidos em frangos (OS161 e S1133), peru (Muntrilj06) e avestruz (Ost1), muito embora ficando em um grupo separado. Das 15 sequências obtidas, 13 foram mais similares entre si, enquanto que as amostras AVE 29 e 49 foram mais divergentes (Fig. 28).

**Figura 28** - Árvore filogenética construída usando as sequências do gene S2 do ARV amplificadas de 15 amostras de *pool* fecal de aves.



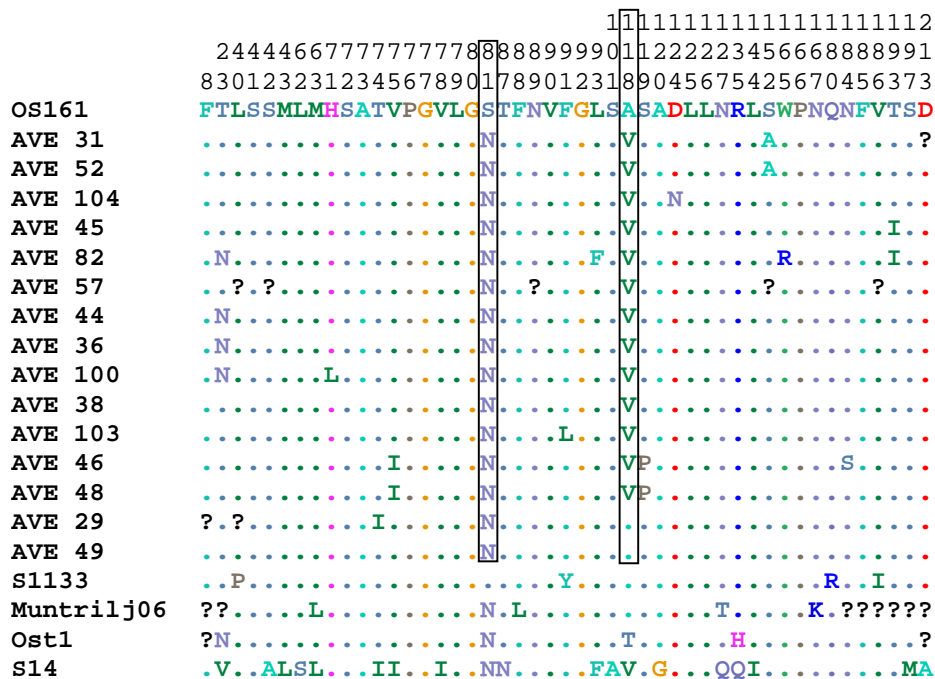
Sequências começando em “AVE” são do presente estudo. A árvore filogenética foi construída pelo método de neighbour-joining e Kimura dois parâmetros. Os valores de *bootstrap* (2.000 réplicas) estão indicados nos nós da árvore. Valores menores que 70% não estão representados. A barra de escala é proporcional à distância filogenética. O protótipo de ARV de mamífero (Baboon reovirus) foi incluído como grupo externo para melhor entendimento dos relacionamentos genéticos entre as cepas. CK=Frango; TK=Peru; OS=Avestruz; DU=Pato; GO=Ganso.



O gene S2 dos ARV do presente estudo apresentaram entre 90,1 e 100% de similaridade ao nível de nt e entre 96,6 e 100% ao nível de aa entre si. Na comparação das sequências deste estudo com os dois protótipos obtidos de amostras de frango, os valores observados, respectivamente, ao nível de nt e aa foram de 90,9 a 94,4% e 95,2 a 99,5%. Quanto aos protótipos das demais espécies incluídas nas análises, tais valores variaram de 86-91,1% (nt) e 95,3-99% (aa) para peru e avestruz e de 69,5-73,1% (nt) e 90,6-91,3% (aa) para pato e ganso.

A análise da sequência de aa (correspondendo as posições 8 a 215 da proteína  $\sigma$ A da amostra OS161) revelou algumas substituições nas amostras da mesorregião metropolitana de Belém, sendo as mais características observadas nos resíduos S81N e A118V (Fig. 29).

**Figura 29** - Alinhamento das sequencias deduzidas de aa detectadas neste estudo em comparação com o protótipo OS161.



Os números no topo demonstram a posição do aa na sequência. Um ponto indica identidade de aa em comparação com a sequência referência naquela posição e (?) indica sequência não determinada. As principais substituições características nas amostras da mesorregião metropolitana estão em destaque.

## 7 DISCUSSÃO

Embora a literatura sobre vírus segmentados de RNAfd em aves não seja abundante, alguns trabalhos enfocando aspectos epidemiológicos ajudam a traçar o panorama das infecções ocasionadas por estes agentes em todo o mundo. Essa detecção baseava-se essencialmente na EGPA, já que o perfil eletroforético exibido por essa técnica é característico, possuindo especificidade relativamente alta, mas com baixa sensibilidade (TAMEHIRO et al., 2003; OTTO et al., 2006; BÁNYAI et al., 2008; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; ISLAM et al., 2009; JINDAL et al., 2010a, 2010b; OTTO et al., 2012).

Nenhuma das amostras estudadas pela EGPA neste estudo apresentaram padrão de migração eletroforética compatível com RVA-A. No Brasil, Tamehiro et al. (2003) encontraram perfil eletroforético característico de RVA-A em 9,4% das amostras positivas para RVA utilizando amostras fecais de frangos de corte colhidas sobre a cama do aviário em forma de pool. Na Alemanha, Otto et al. (2006) descreveram maior frequência ao RVA-D por EGPA do que os demais grupos que ocorrem em aves, sendo que das 41 amostras fecais colhidas a partir do conteúdo intestinal e analisadas pela EGPA somente quatro apresentaram perfil eletroforético característico de RVA-A. Nenhum dos eletroferotipos detectados no estudo de Islam et al. (2009) em amostras colhidas diretamente da cloaca e analisadas individualmente e Niture et al. (2010), em aves de corte e postura da Índia, apresentaram padrão de migração do RNA compatível com RVA-A. Otto et al. (2012), verificaram que o RVA-D foi o mais prevalente grupo encontrado nas amostras fecais e de conteúdo intestinal de frangos analisadas por EGPA (29,3%), sendo que o RVA-A só foi encontrado em 3% das amostras de frangos estudadas.

Em relação ao PBV, a positividade de 15,3% observada neste estudo nas amostras analisadas por EGPA é semelhante ao quadro observado no Brasil por Alfieri et al. (1988) e Leite et al. (1990), os quais detectaram o PBV em amostras fecais de frangos de corte em 14,2% e 17,1% dos casos, respectivamente. Situações que contrastaram com o observado por Tamehiro et al. (2003) que, utilizando o mesmo método de colheita e análise deste estudo, encontraram menor positividade (3,4%) ao pesquisar o PBV em amostras fecais de frangos de corte no sul do Brasil.

Quanto ao ARV, os resultados da frequência detectada pela EGPA nesta pesquisa (1,2%) assemelham-se aos poucos trabalhos disponíveis na literatura. No Brasil, Alfieri et al. (1989b) e Tamehiro et al. (2003) encontraram o ARV em 9,26% e 1,8% das amostras fecais de frangos de corte, respectivamente.

Em uma análise geral, quando as frequências observadas neste estudo para os três vírus foram comparadas com os resultados descritos na literatura, verificou-se a presença de resultados muito semelhantes, o que pode estar relacionado com a população alvo destes estudos (basicamente frangos de corte) e os métodos de criação que, normalmente, seguem padrões semelhantes no território nacional e em várias partes do mundo.

Quando os resultados obtidos por EGPA foram confrontados com os de RT-PCR, verificou-se a baixa sensibilidade do primeiro em relação ao segundo (dados não mostrados), situação bastante discutida na literatura (TAMEHIRO et al., 2003; OTTO et al., 2006; BÁNYAI et al., 2008; PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; ISLAM et al., 2009; JINDAL et al., 2010a, 2010b; OTTO et al., 2012). No entanto, outros fatores comentados a seguir também podem ter influenciado na baixa sensibilidade do EGPA.

Segundo Otto et al. (2006, 2012) os RVA-A são excretados frequentemente em títulos baixos nas fezes de animais sem sinais clínicos, ao contrário do que ocorre com os RVA-D. Embora o foco deste estudo não tenha sido a avaliação clínica dos rebanhos, de uma forma geral, não se observou problemas sanitários nos rebanhos pesquisados, reforçando esta hipótese como uma das prováveis causas da não obtenção de amostras positivas para o RVA-A neste estudo.

Gallimore et al. (1995) reportaram que a maioria dos PBV detectados em fezes de seres humanos estavam em baixa concentração. Wakuda et al. (2005) reforçaram este relato quando colocam que a quantidade de partículas de PBV eliminadas nas fezes é muito pequena. Carruyo et al. (2008), complementam os autores anteriores, aventando a possibilidade de que algumas cepas estariam presentes em carga viral abaixo do limite de detecção pela EGPA. Por outro lado, Bányai et al. (2008) comentam que o PBV teria sido detectado em alguns estudos anteriores que utilizaram a EGPA devido a grandes quantidades de vírus ocasionalmente excretadas nas fezes de uma variedade de mamíferos e aves.

Pantin-Jackwood et al. (2007a) ao desenvolverem pesquisa sobre patologia e distribuição tecidual do ARV em perus, verificaram que o ARV não replicou bem no intestino e foi pouco excretado via cloaca.

Estas afirmações podem ajudar a inferir que os resultados negativos para a detecção dos três vírus pesquisados por EGPA também podem ser resultado dos títulos baixos de excreção viral que eles normalmente apresentam em aves aliado a contaminação por matéria orgânica oriunda da forma de colheita destas amostras.

De acordo com Villarreal et al. (2006), a utilização do cultivo celular em associação a EGPA é recomendada para a melhoria da resolução de amostras que apresentam segmentos genômicos com fraca visualização. Esta alternativa seria válida para o RVA e ARV, visto que o PBV, até o presente, não parece ser cultivável (WAKUDA et al., 2005; SYMONDS et al., 2009; FREGOLENTE, 2010).

Os resultados deste estudo para detecção do RVA, PBV e ARV por EGPA podem também ter sido influenciados pelo uso, na etapa de preparação das suspensões fecais, da centrifugação em força de 700 x g, menor do que a comumente empregada nos trabalhos que também utilizaram este teste diagnóstico (OTTO et al., 2006; VILLARREAL et al., 2006; WANG et al., 2007; OTTO et al., 2012). Desta forma, a utilização de uma maior força g entre 2.000 e 12.000 poderia ter melhorado a concentração do ácido nucleico do vírus e, conseqüentemente, a visualização dos segmentos genômicos, gerando maiores resultados positivos.

A RT-PCR é capaz de detectar o ácido nucleico viral durante os estágios iniciais da infecção sem a necessidade do aparecimento de altos títulos de vírus em amostras clínicas nas espécies acometidas (NITURE et al., 2010). Nesse sentido, Otto et al. (2006, 2012) verificaram que algumas amostras que foram negativas na EGPA mostraram-se positivas na RT-PCR, indicando a alta sensibilidade deste último teste e demonstrando a baixa sensibilidade da EGPA.

Em relação aos resultados obtidos por RT-PCR, no caso do RVA a positividade obtida de 41,2% neste estudo foi menor do que a descrita por Pantin-Jackwood et al. (2007b), nos E.U.A, em perus comerciais sadios que foi de 67,7% usando o mesmo método e gene, mas diferentes iniciadores. Subseqüentemente, Jindal et al. (2010a), nos E.U.A, encontraram menores frequências (30,6%) quando testaram amostras fecais de perus comerciais por RT-PCR, usando o mesmo gene e iniciadores que Pantin-Jackwood et al. (2007b). A utilização de diferentes

iniciadores, ainda que tendo como alvo o mesmo gene pode ocasionar diferenças na sensibilidade do teste e, portanto, nos resultados obtidos (OTTO et al., 2012).

A comparação entre os resultados para PBV obtidos por RT-PCR nas amostras da mesorregião metropolitana de Belém (49,4%) e a literatura esbarra no desconhecimento ou indisponibilidade de trabalhos desenvolvidos em frangos empregando esta ferramenta molecular. Desta forma, alguns trabalhos ao redor do mundo que utilizaram a mesma técnica e iniciadores empregados nesta pesquisa demonstraram que a prevalência do PBV em diferentes espécies (humanos, suínos, répteis, caninos e roedores) e amostras de água de esgoto pode variar muito (0,86-100%) (BHATTACHARYA et al., 2006; BÁNYAI et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; SYMONDS et al., 2009). Vale ressaltar que devido o uso de somente iniciadores que identificam amostras pertencentes ao genogrupo I dos PBV nesta pesquisa, estima-se que a real prevalência das picobirnaviroses entre os frangos de corte da área estudada pode estar subestimada, haja vista que amostras pertencentes ao genogrupo II ou não-I e não-II estariam de fora dos dados obtidos (CARRUYO et al., 2008; GANESH et al., 2012). Portanto, segundo Fregolente et al. (2010), são necessários estudos que definam por uma sequência nucleotídica única e conservada, que permita o desenho de iniciadores capazes de diagnosticar todos os PBV.

De forma semelhante, para o ARV, pouca literatura enfocando a epidemiologia molecular e tendo como alvo o gene S2 está disponível. Contudo, a prevalência de 32,9% observada nas amostras deste estudo pode ser comparada aos achados de Lojkic´ et al. (2010) na Croácia, que encontraram o ARV em 13% das amostras fecais de perus utilizando os mesmos iniciadores aqui empregados. Posteriormente, Reck (2011) em estudo envolvendo a RT-PCR, mas tendo como alvo o gene S1, obteve 33,9% de positividade nas amostras de frangos analisadas no Brasil.

Diferenças nas frequências das infecções por vírus entéricos são encontradas e podem ser influenciadas por inúmeros fatores como, desenho do estudo, sensibilidade analítica do método de escolha, país aonde o estudo foi feito, condições climáticas, virulência da cepa, falhas no manejo, período em que o estudo foi desenvolvido (por exemplo, esporádico versus surto), espécies (exemplo, animais

domésticos versus animais de zoológico), idade, presença de doenças (casos diarreicos ou não diarreicos) e condições ocultas (pacientes imunocomprometidos versus imunocompetentes), estado fisiológico (condições estressantes, parto e lactação), tamanho da amostra, métodos de detecção e coinfeções (KARIM et al., 2007; MARTINEZ et al., 2010; GANESH et al., 2012).

Segundo Furtado et al. (2005), na moderna avicultura, devido a expansão da produção de frangos e ao aumento dos custos de construção, há o interesse em aumentar o número de aves por m<sup>2</sup>, a fim de maximizar a produção por área, porém sem expandir o número de galpões. Em climas tropicais e subtropicais, a alta intensidade de radiação e os elevados valores de temperatura e umidade relativa do ar representam condições de desconforto térmico, no interior das instalações, que podem restringir o desenvolvimento e a reprodução dos animais e causar situações de estresse nas aves (LIMA et al., 2009). Por sua vez, condições de estresse provocadas pelo manejo dos animais podem contribuir para as altas taxas de detecção do PBV em estudos de população (MARTINEZ et al., 2010). Esta afirmação feita para o PBV poderia também aplicar-se a outros vírus entéricos segmentados, como no caso deste estudo.

A prevalência do RVA nos municípios estudados variou entre 0% (Ananindeua e Santo Antônio do Tauá) e 80% (Belém) mostrando diferenças significativas na disseminação do vírus na região estudada (Tabela 1). Achados similares foram encontrados por Karim et al. (2007), os quais observaram que a prevalência do RVA em frangos mostrou significativa variação em diferentes distritos. Para PBV e ARV, também foram encontradas áreas de alta e baixa prevalência, sendo que não há conhecimento ou disponibilidade na literatura de trabalhos enfocando este tipo de abordagem.

A presença de áreas com alta prevalência de RVA (Belém, Santa Bárbara e Santa Isabel), PBV (Santa Bárbara, Benevides, Castanhal, Inhangapi e Belém) e ARV (Castanhal, Inhangapi e Belém) abrangeu seis dos oito municípios pesquisados, demonstrando a ampla disseminação desses vírus entéricos entre a população de frangos de corte na mesorregião metropolitana de Belém. Esta disseminação pode ser explicada pela alta concentração de granjas em pelo menos três destes municípios (Santa Isabel, Castanhal e Benevides). Com isso, as distâncias entre as granjas são menores e, mesmo com a adoção de medidas

profiláticas pelos criadores, o risco de disseminação de agentes infecciosos se torna maior. Embora apresentassem uma concentração de granjas menor que Santa Isabel, Castanhal e Benevides, os outros três municípios restantes com alta prevalência de dois ou mais vírus pesquisados (Belém, Santa Bárbara e Inhangapi), apresentavam granjas pertencentes às mesmas empresas (integradoras 1 e 2) que atuavam na área com a maior concentração de granjas. Desta forma, acredita-se na possibilidade de constantes intercâmbios de fornecedores de insumos e material genético entre as granjas pertencentes a estes seis municípios mais acometidos por RVA, PBV e ARV. Por outro lado, na área onde houve menor prevalência do RVA, PBV e ARV representada por Ananindeua e Santo Antônio do Tauá, havia uma baixa concentração de granjas no primeiro, enquanto que outra empresa (integradora 3) diferente daquelas presentes nos municípios mais acometidos (integradoras 1 e 2) era responsável pelo processo de integração das granjas pesquisadas no segundo município. Portanto, futuras investigações, inclusive com adoção de questionários epidemiológicos, podem ajudar a elucidar se a densidade de granjas avícolas nos municípios e as medidas de manejo adotadas pelas integradoras nas propriedades seriam os principais fatores de risco para disseminação de agentes infecciosos entre as granjas, auxiliando na elucidação das principais diferenças estatísticas encontradas entre os municípios estudados.

Esta pesquisa identificou RVA em maior frequência nos frangos acima de 15 dias de idade. Yason e Schat (1987) sugeriram que pela maior demora na substituição das células epiteliais das vilosidades intestinais em aves de maior idade, as adultas seriam mais susceptíveis às infecções por RVA. Tamehiro et al. (2003), encontraram fundamento nestas afirmações ao observarem maior positividade de RVA em amostras de frangos de corte com idade acima dos 15 dias. No entanto, Islam et al. (2009) (em frangos de corte), Pantin-Jackwood et al. (2008) (em frangos comerciais) e Jindal et al. (2010a) (em perus comerciais) quando estudaram a presença do RVA, verificaram que a faixa etária até os 15 dias de idade foi a mais acometida.

A comparação entre os resultados para PBV obtidos nesta pesquisa e os da literatura, com relação à faixa etária, é dificultada pela escassez de trabalhos desenvolvidos em frangos enfocando este aspecto. No entanto, dentre as amostras positivas, Tamehiro et al. (2003) encontraram maior positividade (69,2%) para o PBV em amostras fecais de frango com idades entre 35-49 dias. Estes achados

corroboram com os resultados encontrados nas amostras da mesorregião metropolitana de Belém, visto que a maior positividade (69%), dentre as amostras positivas, foi encontrada nos frangos entre 31-45 dias.

O ARV foi identificado em maior frequência nos frangos acima de 15 dias de idade nas amostras pertencentes à mesorregião metropolitana de Belém, corroborando com as pesquisas de Tamehiro et al. (2003) e Jindal et al. (2010a). Pantin-Jackwood et al. (2008) encontraram resultados discordantes ao detectarem o ARV com maior frequência em amostras fecais de frangos com idades abaixo dos 15 dias.

McNulty et al. (1983) descreveram que o RVA é normalmente excretado nas fezes de frangos menores que 14 dias de idade devido a provável modulação da imunidade passiva de origem materna. Subsequentemente, McNulty et al. (1984) sugeriram que o estabelecimento do RVA em algumas faixas etárias pode ocorrer por fatores tais como suscetibilidade dos animais mais jovens, nível de imunidade passiva, dose infectante, diferenças no manejo e condições estressantes. Os fatos anteriormente descritos, aliados a questões geoclimáticas podem ajudar a explicar as principais diferenças estatísticas observadas para o RVA e PBV, sendo que estes fatores parecem não afetar significativamente a frequência do ARV entre as faixas etárias pesquisadas. Como não há conhecimento de trabalhos utilizando esta metodologia estatística na pesquisa destes agentes virais aqui enfocados, estima-se que futuros trabalhos poderiam contribuir no aprofundamento das respostas sobre as diferenças estatisticamente significativas observadas nas frequências entre as faixas etárias.

O maior número de amostras positivas para o RVA foi observado em animais submetidos a altas densidades populacionais ( $>9$  aves/m<sup>2</sup>) e diferenças estatisticamente significantes foram observadas quando comparadas com animais submetidos a baixas densidades ( $\leq 9$  aves/m<sup>2</sup>) (Tabela 7). De acordo com Manno et al. (2011) frangos alojados em galpões com altas densidades podem ser predispostos a problemas sanitários. Provavelmente, a maior proximidade entre as aves por m<sup>2</sup> facilitou a circulação do RVA entre as granjas com maior densidade e dificultou nas de menor densidade. Por outro lado, embora tenham sido verificadas maiores frequências de positividade para PBV e ARV em animais sob alta densidade, a proporção entre os casos positivos e negativos em relação à



densidade populacional não diferiu estatisticamente de forma significativa no caso dos PBV e ARV.

A mesorregião estudada é a maior produtora de frangos de corte do estado do Pará. Muito embora existam diferentes integradoras desenvolvendo atividades comerciais nesta área, em alguns casos, o mesmo fornecedor abastece uma ou mais integradoras com seus produtos (material genético, cama de frango, ração, etc.). Esta constatação pode ajudar na explicação sobre a falta de diferença significativa encontrada entre as três integradoras participantes do estudo para os três vírus estudados.

A sazonalidade é uma característica de muitas doenças e pode variar de acordo com o agente sob estudo. Em frangos, Barrios et al. (1991) encontraram uma distribuição sazonal uniforme entre as estações estudadas. Segundo Linhares (2000) a distribuição sazonal das gastroenterites por RV no Brasil demonstrou um marcante perfil sazonal com maior incidência em regiões temperadas nos meses mais secos. Com isso, o Pará apresenta significativa incidência de diarreia infantil por RV durante os meses com baixa precipitação pluviométrica. Na Índia, Karim et al. (2007) detectaram a maior porcentagem de RVA positivos em amostras fecais de frangos no verão. Em seres humanos, Van Leeuwen et al. (2010), não observaram sazonalidade como regra para as infecções por PBV. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as estações estudadas para os RVA, PBV e ARV, embora para este último tenha se observado destacada frequência no verão amazônico (Tabela 9). A distribuição uniforme encontrada entre as estações pode estar relacionada às condições climáticas da região, as quais não apresentam grandes variações na temperatura e umidade ao longo das duas estações. Os resultados aqui demonstrados indicam uma tendência; entretanto, a aquisição de dados como índice pluviométrico e média da temperatura e umidade relativa do ar no período compreendido entre as colheitas poderia ajudar no aprofundamento das análises quanto aos dados obtidos em relação às estações do ano.

A análise dos resultados obtidos nesta pesquisa (74,1% foram positivas para um ou mais vírus testado) indicou a presença de infecções mistas ocorrendo nas propriedades estudadas, além da presença de material genético de diferentes gêneros de vírus ocorrendo na mesma propriedade e galpão (dados não mostrados). Tamehiro et al. (2003), relatam que a utilização de técnica de colheita baseada na obtenção de pool de material fecal pode resultar na observação de contaminação

por bandas não identificadas com massa molecular e concentração equimolar diferentes do RVA, indicando infecções simultâneas. De acordo com Pantin-Jackwood et al. (2007b), a circulação de diversos genótipos e grupos de um tipo de vírus em uma mesma propriedade parece ser uma característica biológica de alguns vírus de RNA. Ao estudarem *pools* de amostras obtidas a partir de conteúdo intestinal de frangos comerciais, Pantin-Jackwood et al. (2008), verificaram que a concomitante infecção dos rebanhos por uma ou mais virose entérica é comum (86%). Posteriormente, Jindal et al. (2010a) em perus, encontraram 61,1% de positividade para uma ou mais viroses entéricas pesquisadas. Portanto, os resultados descritos anteriormente, reforçam os achados obtidos nesta pesquisa e ajudam na explicação da presença de mais de um gênero de vírus em uma mesma propriedade/rebanho e/ou galpão/amostra (infecção mista), sendo que a presença de vários fornecedores de material genético e insumos para uma mesma propriedade também pode ajudar a compor este quadro.

Entre os RVA, somente os do grupo A e D tem sido caracterizados com maiores detalhes. Assim, duas sequências genômicas completas de isolados do RVA-A provenientes de pombo e frango estão disponíveis, enquanto somente uma sequência completa do RVA-D proveniente de frango foi divulgada (ITO et al., 2001; TROJNAR et al., 2009; TROJNAR et al., 2010).

A restrita associação de alguns RVA com outros RV identificados em aves previamente publicados pode indicar que os RVA podem agrupar baseado na sua localização geográfica (PANTIN-JACKWOOD et al., 2008; JINDAL et al., 2010b). Muito embora os RVA deste estudo tenham sido mais relacionados aos previamente reportados RVA obtidos a partir de amostras colhidas em frangos da Alemanha (02V0002G3), Irlanda (Ch-1), E.U.A (AR-SEP-840 e NC-SEP-839) e Brasil (USP336-13), a análise filogenética apontou que as sequências do gene NSP4 dos RVA deste estudo agruparam separadamente demonstrando a regionalização destas amostras. Por outro lado, não houve um padrão de restrição geográfica das cepas dentro da mesorregião estudada (ex. agrupamento específico de amostras relacionado a um município) e/ou fatores genéticos que sugerissem a existência de diferentes grupos genéticos ou variantes. Sendo assim, estes resultados parecem inferir que há um isolamento geográfico das cepas que estariam circulando na região, ou seja, mesmo que cepas oriundas de outras regiões geográficas do país estejam adentrando na

mesorregião metropolitana de Belém, elas não estariam se adaptando as condições locais.

A possibilidade de transmissão entre espécie e reestruturação de segmentos genômicos entre RVA-A tem sido reportado por Schumann et al. (2009). Os resultados desta pesquisa demonstraram o agrupamento dos RVA da mesorregião metropolitana em um grupo separado daqueles pertencentes a amostras de RVA obtidas em perus e pombos indicando concordância com as observações feitas por Trojnar et al. (2009) e Jindal et al. (2010b) os quais indicaram que a transmissão entre espécie dos RVA pode não ser um fenômeno comum.

Na análise completa da ORF, Matthinjssens et al. (2008) recomendam que se a identidade entre o gene da nova cepa sob investigação e cepas pertencentes a um estabelecido genotipo "X" for acima do ponto de corte (*cut off*) (85% para o gene NSP4) do protótipo estabelecido, a cepa sob estudo pode ser classificada como genotipo "X". As amostras do presente estudo tinham entre 87,5 e 89,3% de identidade nucleotídica quando comparadas com o protótipo E10 (02V000G3), o que leva a dedução de que todas as amostras submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos para o gene NSP4 neste estudo podem ser classificadas como sendo pertencentes ao genotipo E10.

No trabalho de Trojnar et al. (2010), os autores verificaram que as sequências de nt nas regiões terminais dos 11 segmentos genômicos foram idênticas entre os RVA-A e RVA-D. Desta forma, estes autores sugerem futuras investigações no sentido de estudar a possibilidade de troca entre os segmentos genômicos de RVA-A e RVA-D devido a presença destas estruturas conservadas. A partir desta possibilidade, Johne et al. (2011) alertam que o grupamento ou classificação de uma amostra de vírus baseado somente em um segmento genômico deve ser feito com cautela. Assim, visto que neste estudo somente foram analisados fragmentos de 632 pb do gene NSP4, os resultados obtidos permitem afirmar que em 35 amostras colhidas foi possível a observação do material genético do RVA e 20 destas apresentavam fragmento do gene NSP4 pertencente ao grupo A genotipo E10.

De acordo com Ito et al. (2001), cinco domínios funcionais foram mapeados na NSP4 de mamíferos, sendo que somente o domínio de ligação da VP4 (aa 112-148), especialmente a região do domínio da enterotoxina (aa 114-135) é conservado

quando compararam RV de mamíferos e aves. Posteriormente, Mori et al. (2002) descreveram que a região abrangendo os aa 109-135 da proteína NSP4 foi idêntica entre aves e apresenta atividade enterotoxigênica em RV de aves. Os resultados obtidos evidenciam que as amostras da mesorregião metropolitana de Belém apresentaram esta região bastante conservada, quando comparadas ao protótipo PO-13, o que sugere que esta atividade enterotoxigênica está presente na proteína NSP4 dos RVA detectados nas amostras aqui analisadas.

Até o momento, poucos trabalhos disponibilizaram a sequência completa ou quase completa do segmento genômico 2 dos PBV pertencentes ao genogrupo I (GREEN et al., 1999; ROSEN et al., 2000; WAKUDA et al., 2005; GHOSH et al., 2009; VAN LEEUWEN et al., 2010). No entanto, a disponibilização de sequências parciais do gene RdRp vem se acumulando ao redor do mundo e em uma variedade de espécies animais (BHATTACHARYA et al., 2006; BÁNYAI et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; SYMONDS et al., 2009; GIORDANO et al., 2011).

Alguns estudos demonstraram que cepas isoladas em casos geograficamente distintos foram mais relacionadas entre si do que com cepas identificadas no mesmo surto (BÁNYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008). Nos E.U.A, sequências idênticas de PBV obtidas de amostras ambientais foram recuperadas de diferentes estados da nação (SYMONDS et al., 2009). Posteriormente, estudos na Índia detectaram PBV em crianças diarreicas geneticamente relacionadas com cepas de suínos reportadas em outras regiões geográficas (GANESH et al., 2010, 2011a). Outro estudo, na Índia, detectou um PBV em uma égua diarreica o qual compartilhou completa identidade de sequência com uma cepa previamente descrita de PBV obtida em humano na mesma área, além de apresentar estreita homologia com cepas de PBV obtidas em suínos reportadas na Hungria (GANESH et al., 2011b). Os resultados observados nas amostras da mesorregião metropolitana de Belém são consistentes com os da literatura e evidencia a rápida disseminação dos PBV a novos locais geográficos ao redor do mundo, o que pode estar sendo influenciado tanto pela presença de ancestrais em comum entre as amostras mais similares pertencentes a diferentes localidades geográficas, como também pela diminuição das barreiras comerciais entre os países. Ganesh et al. (2011a) advertem que uma intensa vigilância e monitoramento são essenciais para um melhor entendimento sobre o padrão evolutivo dos PBV que circulam em diferentes regiões geográficas.

Algumas variantes pertencentes a diferentes amostras estiveram mais próximas a um mesmo protótipo (ex. AVE 54v1, AVE 57v1, AVE 61v1, AVE 70v4 e AVE 104v1 com a amostra D4), enquanto que variantes pertencentes a uma mesma amostra tiveram maior identidade de sequência nucleotídica com variantes de outras amostras do que entre si (ex. 74% entre AVE 77v1 e AVE 77v3, e 99,5% entre AVE 77v1 e AVE 35v1), confirmando a diversidade genética dos PBV citada na literatura.

Alguns aspectos encontrados na literatura podem ser relevantes para ajudar no entendimento da diversidade genética e da presença de diferentes sequências originadas de uma mesma amostra apresentadas neste estudo.

Um alto nível de diversidade genética do genogrupo I dos PBV vem sendo reportada tanto em humanos quanto em suínos (BÁNYAI et al., 2008; BHATTACHARYA et al., 2007; VAN LEEUWEN et al., 2010). FREGOLENTE (2010) após clonagem de amostras pertencentes a diferentes espécies (suínos, roedores, equinos e coelhos) verificou a presença de variantes genômicas dentro de cada PBV e a coexistência de diferentes populações de PBV em um mesmo indivíduo. Além disso, também verificou uma alta taxa de heterogeneidade entre as variantes genômicas de cada PBV e explica que, uma maior variabilidade viral é esperada em hospedeiros que vivem em ambientes que permitam um maior contato entre os indivíduos, mesmo que, estejam confinados em um mesmo ambiente. Os resultados desta pesquisa estão de acordo com esta afirmação, visto que a população utilizada foi de frangos vivendo em situação de confinamento, sendo que, em algumas granjas, a média chegava a 20.000 frangos/galpão.

Bruenn (1991, 1993) havia reportado que o gene que codifica para RdRp dos RNAfd e alguns RNA de fita simples apresentam regiões variáveis fora dos seus motivos conservados, explicando a diversidade entre os diferentes membros do mesmo genogrupo. Fregolente (2010) complementa, informando que a elevada heterogeneidade genética observada em vírus de RNA pode ser consequência de uma alta taxa de erro da RdRp dos PBV, como ocorre com outras RNA polimerases. Contrariamente, Giordano et al. (2011), ao utilizarem os mesmos iniciadores que os deste estudo na mesorregião metropolitana de Belém, colocam que os resultados de sua pesquisa em humanos e suínos sugerem que as sequências identificadas

podem corresponder a regiões estáveis e geneticamente conservadas do segmento genômico 2 do PBV.

Segundo Bányai et al. (2008), um notável resultado em seu estudo foi a detecção de infecções mistas por diferentes cepas não relacionadas de PBV em suínos. Carruyo et al. (2008) alertaram para a possibilidade de se obter diferentes sequências originadas de uma mesma amostra, o que pode ser fruto do reconhecimento dos iniciadores a diversas cepas presentes em uma mesma amostra. Fregolente (2010) ressaltou que encontrou uma variação na sequência de nucleotídeos dos PBV muito grande e em alguns animais foi constatado que estavam sendo infectados por dois tipos diferentes de PBV. Neste estudo, desde as primeiras tentativas de sequenciamento, antes da clonagem já foi possível a percepção da presença de infecções mistas de PBV (diferentes sequências originadas de uma mesma amostra) a partir da análise dos primeiros cromatogramas gerados, o que tornou muito difícil a apreciação das sequências devido a ocorrência de “picos duplos” na sequência produzida. Com isso, a clonagem foi a alternativa desenvolvida para a solução deste problema, possivelmente gerado pela origem do material colhido, ou seja, amostras fecais colhidas em “pool” representativa daquela população de frangos de corte muitas vezes vindos de diversos fornecedores na mesma propriedade e criados sob confinamento.

Outro fato interessante observado em algumas amostras de PBV deste estudo foi a maior semelhança entre estas e os protótipos de outras espécies ou materiais (ex. AVE 77v3 com VS137 obtida em humano – Tabela 11). Esta situação é bem discutida na literatura. Bányai et al. (2008), sugeriram que cepas de PBV possam ser facilmente transmitidas de um hospedeiro a outro, fornecendo evidências da ampla gama de hospedeiros que este vírus pode apresentar. Embora alguns estudos apontem o contrário, Symonds et al. (2009) acreditam que quando cepas de PBV, obtidas a partir de diferentes espécies ou fontes de contaminação, são comparadas filogeneticamente e grupamentos próximos são obtidos, isto provavelmente pode ser resultado da natureza conservada do gene RdRp. Não está claro se um hospedeiro poderia servir como reservatório para outra espécie animal aonde a mesma cepa de PBV foi encontrada; no entanto, no caso do rotavírus, este evento é geralmente interpretado como uma evidência de transmissão entre espécies (GANESH et al., 2012). A presença da mesma cepa de PBV em diferentes

espécies animais poderia ocorrer devido à exposição destes hospedeiros a mesma fonte de contaminação, o que pode estar acontecendo via transmissão pela água (GANESH et al., 2012).

Ao analisarem um fragmento curto do gene RdRp (168pb) de amostras clonadas de PBV obtidas em suínos, Bányai et al. (2008), observaram que a similaridade nucleotídica entre as amostras de suínos clonadas do genogrupo I variou entre 54,5 e 100%. Resultados similares foram encontrados nas amostras da mesorregião metropolitana de Belém (50,3-100%), confirmando a variabilidade genética que o PBV pode apresentar, mesmo entre amostras colhidas na mesma população ou indivíduo.

Diversas diferenças aminoacídicas foram encontradas nas amostras de PBV sequenciadas neste trabalho. No entanto, mesmo com esta diversidade aminoacídica, o domínio D-S/T-D apresentou-se conservado em todas as variantes sequenciadas, quadro frequentemente relatado na literatura mesmo em diferentes espécies (MARTÍNEZ et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2006; FREGOLENTE, 2010; GANESH et al., 2010). Ganesh et al. (2012) confirmam estes achados na medida que informam que os iniciadores PicoB25<sup>+</sup> e PicoB43<sup>-</sup> (usados neste estudo) mapeiam o domínio D-S/T-D do gene RdRp dos vírus RNAfd, sendo que este domínio pode ser identificado, com poucas exceções, na maioria das cepas de PBV. Assim, mesmo confirmando a conservação deste domínio muito pesquisado, estudos posteriores são de grande importância a fim de se elucidar as consequências das mudanças aminoacídicas observadas em termos evolutivos e de funcionalidade para a proteína dos PBV sequenciados.

De uma forma geral, quando consideramos a soma das análises nucleotídicas e aminoacídicas entre as amostras sequenciadas neste trabalho e os protótipos, verificamos que os resultados ratificam a diversidade descrita para o gene RdRp do PBV (BRUENN, 1991, 1993; FREGOLENTE, 2010). Algumas possibilidades para esta diversidade observada podem estar tanto no pequeno tamanho do fragmento analisado quanto na variabilidade do gene estudado, sendo que o tamanho do fragmento aqui analisado não permite avaliar com precisão a extensão de tal diversidade e sua significância biológica (MARTÍNEZ et al., 2003).

De acordo com Ganesh et al. (2012), significantes avanços no entendimento da composição genética dos PBV foram alcançados desde o início dos anos 2000, resultado da disponibilidade dos testes de diagnóstico molecular. No entanto, os autores colocam em dúvida se um sistema de genotipagem baseado na comparação de um fragmento de aproximadamente 160 pb de um único gene de um vírus RNA segmentado geraria resultados e conclusões confiáveis para estudos de epidemiologia molecular.

Para o ARV, os resultados desta pesquisa apontaram maior relacionamento das amostras de frango da mesorregião metropolitana de Belém com os protótipos obtidos em amostras de aves e menor relacionamento com os protótipos de mamíferos. Zhang et al. (2006) demonstraram que o gene que codifica a  $\sigma A$  do DRV/GRV e ARV segregou em diferentes grupos, mas foram mais relacionados entre si do que com os demais (MRV e BRV). Além disso, seis amostras de ARV obtidas a partir de frangos foram 100% homólogas em relação a sequências correspondentes no banco de genes. A segregação ocorrida entre as amostras de frango da mesorregião metropolitana e os DRV/GRV em grupo diferentes (embora mais relacionados entre si do que entre mamíferos) pode ter explicação nos fatos observados por Bányai et al. (2011), que ao analisarem filogeneticamente uma cepa de ARV obtida em uma amostra de pool de conteúdo intestinal e bursa de frangos de corte, sugeriram que esta cepa ou seus ancestrais teriam adquirido seu arcabouço genético de várias cepas através de um complexo mecanismo evolucionário, aonde rearranjos entre segmentos genômicos cognatos e subsequentes divergências entre genes individuais poderiam levar na geração desta cepa de ARV geneticamente distinta.

Lojkic' et al. (2010), na Croácia, observaram que a análise sequencial de um fragmento do gene S2 mostrou identidade nt de 91,3% quando comparada com outras seis cepas obtidas em frangos. Comparação feita entre os genes S2 de três cepas de ARV obtidas em frangos (oriundas dos E.U.A) verificou identidade de sequência nt e aa  $\geq 90\%$  entre as mesmas (BÁNYAI et al., 2011).

Os resultados desta pesquisa (90,9 a 94,4% nt e 95,2 a 99,5% aa) corroboraram com os dois trabalhos descritos anteriormente, demonstrando a alta similaridade que as amostras de ARV obtidas em frangos apresentam, mesmo em



diferentes localidades do mundo. Da mesma forma, algumas mudanças aminoacídicas foram observadas nas amostras deste estudo em relação ao protótipo OS161. No entanto, de maneira geral, as sequências analisadas demonstraram alta conservação entre si ao longo da região analisada. Os resultados das análises nucleotídicas e aminoacídicas, provavelmente são resultado da conservação observada pela  $\sigma$ A entre as cepas de ARV (ZHANG et al., 2003).

A natureza segmentada dos vírus facilita a ocorrência da reestruturação de segmentos genômicos, sendo este um dos mecanismos importantes para a evolução viral e para a geração da diversidade genética não só dos RV, como também de outros vírus segmentados (ABE et al., 2009; FREGOLENTE, 2010; WONG et al., 2012).

Segundo Trojnar et al. (2009) e Bányai et al. (2011), a disponibilização de sequências genômicas pode ser a base para o desenvolvimento de novos testes diagnósticos, os quais podem ser usados para determinar a significância clínica e a distribuição das viroses entéricas em aves de corte, além de ajudar no entendimento da heterogeneidade observada entre as várias viroses entéricas de natureza segmentada. Além disso, também pode ajudar na avaliação da probabilidade de transmissão destas viroses para humanos e na habilidade de gerar rearranjos.

Repetidas exposições de humanos a cepas heterólogas, mas geneticamente relacionadas destas viroses, provenientes de grandes quantidades de partículas virais excretadas por animais domésticos infectados, podem representar um risco ocupacional para a saúde e merece atenção das autoridades (BÁNYAI et al., 2008).

Estudos continuados enfocando outros aspectos epidemiológicos e genéticos relacionados a estes três vírus são de suma importância na elucidação dos processos evolutivos e biológicos destes agentes, bem como na avaliação dos reais riscos e prejuízos que eles podem causar na avicultura e saúde pública paraense.

As análises realizadas neste estudo permitiram ampliar o conhecimento da diversidade genética e da circulação das diferentes cepas e/ou variantes dos RVA, PBV e ARV, representando pesquisa pioneira sobre sequenciamento gênico desses vírus em aves no Brasil e ajudando na adoção de medidas preventivas a disseminação destes agentes nos plantéis de frangos de corte dos municípios estudados.

## 8 CONCLUSÕES

1. Os RVA, PBV e ARV circularam em granjas de frangos de corte da mesorregião metropolitana de Belém.
2. Não foi possível a identificação de RVA-A por EGPA e, conseqüentemente, o eletroferotipo dos mesmos. No caso do PBV, o único eletroferotipo identificado foi o longo. A única amostra de ARV detectada pela EGPA apresentou perfil eletroforético aviário.
3. Os oito municípios pesquisados apresentaram frequência de pelo menos um vírus estudado, sendo que para todos os vírus foram observadas áreas de alta, intermediária e baixa prevalência.
4. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas entre as frequências dos RVA e PBV em relação aos municípios e faixas etárias. O RVA ainda demonstrou diferença significativa entre as frequências em relação à densidade populacional.
5. O gene NSP4 apresentou maior relacionamento com os protótipos obtidos em frangos e nas amostras entre si, havendo oito diferenças relevantes entre elas em relação ao protótipo 02V0002G3.
6. Os fragmentos do gene NSP4 analisados nas amostras da mesorregião metropolitana apresentaram valor de similaridade compatível com sua classificação dentro do genótipo E10, quando comparadas com um protótipo anteriormente estabelecido do mesmo genótipo.
7. O gene RdRp mostrou a maior variabilidade genética dentre os três vírus estudados, tanto em relação aos protótipos quanto entre si, sendo que algumas variantes agruparam especificamente com protótipos obtidos em outras espécies animais ou fontes de contaminação. Diversas substituições foram observadas nos resíduos das variantes quando comparadas com o protótipo RUBV-P.

8. As diferenças aminoacídicas encontradas nas amostras de PBV sequenciadas neste trabalho são indicativas de que há cepas virais distintas circulando na região sob estudo.
9. O gene S2 apresentou maior relacionamento com os protótipos obtidos em frangos, peru, avestruz e nas amostras entre si, havendo duas diferenças relevantes entre elas em relação ao protótipo OS161.
10. Este é o primeiro estudo envolvendo o sequenciamento gênico do RVA, PBV e ARV em frangos de corte na região norte do Brasil.

## 9 PERSPECTIVAS

1. A partir da identificação dos RVA, PBV e ARV na mesorregião metropolitana de Belém, Pará, pretende-se que os resultados desta pesquisa cheguem aos órgãos executivos da sanidade animal (ex. ADEPARÁ e Ministério da Agricultura), fomentando a adoção de medidas preventivas a disseminação destes agentes nos plantéis de frangos de corte não só dos municípios afetados como no estado do Pará.
2. A advertência aos órgãos competentes que militam na área da saúde pública também deve ser incentivada, uma vez que se verificou um grande contingente de pessoas trabalhando nesta atividade e, conseqüentemente, tendo contato restrito e constante com material altamente contaminado, na maioria das vezes sem qualquer utilização de equipamento de proteção individual, o que é temerário visto o caráter zoonótico atribuído a estas viroses.
3. A realização de estudos futuros de forma a analisar o impacto econômico gerado por essas três viroses estudadas também deve ser fomentado, o que resultaria em uma forma mais efetiva de conscientização dos empresários do setor quanto à necessidade da prevenção destas doenças nos rebanhos.
4. Os resultados aqui obtidos também podem ajudar na construção de um perfil epidemiológico destes vírus e na melhoria do manejo produtivo da avicultura paraense e nacional.
5. A pesquisa dos grupos RVA-F e RVA-G é de suma importância em razão destes grupos também circularem entre aves de corte e por ainda não terem sido relatados no Brasil.

## 10 REFERÊNCIAS

- 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, n. 1-2, p. 250-257, 2009.
- ADEPARA. Agência de defesa Agropecuária do Estado do Pará. **Granjas cadastradas por município da Mesoregião Metropolitana de Belém**, Ofício nº225/2006 ADEPARAÁ/DDA, Belém, 2006.
- ADEPARÁ. Agência de defesa Agropecuária do Estado do Pará. **Granjas cadastradas por município da Mesoregião Metropolitana de Belém**, Ofício s/nº/2012 ADEPARAÁ/Diretoria Técnica, 2012.
- ALFIERI, A.A., ALFIERI, A.F., FREITAS, J.C., SILVA, C.A., FREIRE, R.L., BARROS, A.R., BARREIROS, M.A.B., MULLER, E.E. Ocorrência de *Escherichia coli*, *rotavírus*, *picobirnavírus* e *Cryptosporidium parvum* em um foco de diarreia do pós-desmame em suínos. **Semina.**, v.15, n. 1, p.5-7, 1994.
- ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A., RESENDE J.S., RESENDE, M. A new bisegmented double stranded RNA virus in avian faeces. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 40, p. 437-440, 1988.
- ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A., RESENDE, J.S., RESENDE, M. Atypical rotavirus infections among broiler chickens in Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.41, p. 81-82, 1989a.
- ALFIERI, A.F., ALFIERI, A.A., RESENDE, M., RESENDE, J.S. Detection and propagation of avian enteric reovirus in chicken. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.41, p. 493-501, 1989b.
- ALFIERI, A. F., TAMEHIRO, C.Y., ALFIERI, A. A. Vírus entérico RNA fita dupla, segmentado, em aves: Rotavírus , Reovírus e Picobirnavírus. **Semina: Ci. Agrárias.**, v. 21, n. 1, p.101-103, 2000.
- BALL, J.M., TIAN, P., ZENG, C., MORRIS, A.P., ESTES, M.K. Age-dependent diarrhea induced by a rotaviral nonstructural glycoprotein. **Science**, v. 272, n. 5258, p. 101-104, 1996.
- BÁNYAI, K., DANDÁR, E., DORSEY, K.M., MATÓ, T., PALYA, V. The genomic constellation of a novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting syndrome in broilers. **Virus Genes**, v. 42, n. 1, p. 82–89, 2011.
- BÁNYAI, K., MARTELLA, V., BOGDÁN, Á., FORGÁCH, P., JAKAB, F., MELEG, E., BÍRÓ, H., MELEGH, B., SZUCS, G. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 2, p. 534–539, 2008.

BARNES, H.J., GUY, J.S., VAILLANCOURT, J.P. Poultry enteritis complex. **Rev. Sci. Tech.**, v. 19, n. 2, p. 565–588, 2000.

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

BENAVENTE, J., MARTÍNEZ-COSTAS, J. Avian reovirus: Structure and biology. **Virus Res.**, v. 123, n. 2, p. 105–119, 2007.

BHATTACHARYA, R., GANESH, C.S., NAYAK, M.K., RAJENDRAN, K., DUTTA, P., MITRA, U., BHATTACHARYA, M.K., NAIK, T.N., BHATTACHARYA, S.K., KRISHNAN, T. Detection of Genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhea among children in Kolkata, India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 7, n. 2, p. 229–238, 2007.

BHATTACHARYA, R., GANESH, C. S., NAYAK, M.K., SAHA, D.R., SUR, D., NAIK, T.N., BHATTACHARYA, S.K., KRISHNAN, TRIVENI. Molecular epidemiology of human picobirnaviruses among children of a slum community in Kolkata, India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, n. 6, p. 453–458, 2006.

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, n. 3, p. 495-503, 1990.

BOTTINO, J.A., HIPOLITO, O., JULY, J.R., PINTO, A.A. Agente viral isolado de casos de artrite em frangos de corte e em galinhas de postura. **O Biológico**, v.41, n. 6, p. 168-169, 1975.

BROWNING, G.F., CHALMERS, R.M., SNODGRASS, D.R., BATT, R.M., HART, C.A., ORMAROD, S.E., LEADON, D., STONEHAM, S.J., ROSSDALE, P.D. The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland equine. **Vet. J.**, v. 23, n. 6, p. 405–409, 1991.

BRUENN, J.A. Relationships among the positive strand and double-strand RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, n. 2, p. 217– 226, 1991.

BRUENN, J.A. A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 24, p. 5667–5669, 1993.

BRUSSOW, H., NAKAGOMI, O., GERNA, G., EICHHORN, W. Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 1, p. 67-73, 1992.

CARMONA, R.C.C. **Diversidade Genética dos Rotavírus Humanos detectados em pacientes com diarreia aguda no estado de São Paulo, no período de 1996 a 2006.** 2010. 97fls. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo.

CARRUYO, GABRIELA M., MATEU, G., MARTÍNEZ, L.C., PUJOL, F.H., NATES, S.V., LIPRANDI, F., LUDERT, J.E. Molecular Characterization of Porcine Picobirnaviruses and Development of a Specific Reverse Transcription-PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2402–2405, 2008.

ÇATALOLUK, O., ITURRIZA, M., GRAY, J. Molecular characterization of rotaviruses circulating in the population in Turkey. **Epidemiol Infect.**, v. 133, n. 4, p. 673-678, 2005.

CHACKO, A.R., ARIFULLAH, M., SASTRI, N.P., JEYAKANTHAN, J., UENO, G., SEKAR, K., READ, R.J., DODSON, E.J., RAO, D.C., SUGUNA, K. Novel Pentameric Structure of the Diarrhea-Inducing Region of the Rotavirus Enterotoxigenic Protein NSP4. **Journal of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12721–12732, 2011.

CHANDRA, R. Picobirnavirus, a novel group of undescribed viruses of mammals and birds: a minireview. **Acta Virol.**, v. 41, n. 1, p. 59–62, 1997.

CHUA, K.B., CRAMERI, G., HYATT, A., YU, M., TOMPANG, M.R., ROSLI, J., MCEACHERN, J., CRAMERI, S., KUMARASAMY, V., EATON, B.T., WANG, L-F. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. **PNAS**, v. 104, n. 27, p.11424–11429, 2007.

CHUA, K.B., VOON, K., YU, M., KENISCOPE, C., RASID, K.A., WANG, L-F. Investigation of a Potential Zoonotic Transmission of Orthoreovirus Associated with Acute Influenza-Like Illness in an Adult Patient. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, doi:10.1371. 2011.

CIARLET, M., LIPRANDI, F., CONNER, M.E., ESTES, M.K. Species specificity and interspecies relatedness of NSP4 genetic groups by comparative NSP4 sequence analyses of animal rotaviruses. **Arch. Virol.**, v. 145, n. 2, p. 371-383, 2000.

COSTA, A.P., CUBEL GARCIA, R.C.N., LABARTHE, N.V., LEITE, J.P.G. Detection of double-stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 56, n. 4, p. 554-557, 2004.

DAY, J.M., BALLARD, L.L., DUKE, M.V., SCHEFFLER, B.E., ZSAK, L. Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. **Virology Journal**, v. 7, p. 313, 2010.

DAY, J.M., SPACKMAN, E., PANTIN-JACKWOOD, M. 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. **Av. Dis.**, v. 51, n. 3, p. 681-684, 2007.

DECAESSTECKER, M., CHARLIER, G., MEULEMANS, G. Epidemiological study of enteric viruses in broiler chickens: Comparison of tissue culture and direct electron microscopy. **Avian Path.**, v. 17, n. 2, p. 477-486, 1988.

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

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.

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

DIDSBURY, A., WANG, C., VERDON, D., SEWELL, M.A., McINTOSH, J.D., TAYLOR, J.A. Rotavirus NSP4 is secreted from infected cells as an oligomeric lipoprotein and binds to glycosaminoglycans on the surface of non-infected cells. **Virology Journal**, v. 8, p. 551, 2011.

Dos SANTOS, H.F., LOVATO, LT., FLÔRES, M.L., TREVISOLI, I.M.K., MAZZUTTI, C., PAN, K.A. Anticorpos contra vírus em galinhas de terreiro do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1932-1937, 2008.

DUBOIS, E., LEGUYADER, F., HAUGARREAU, L., KOPECKA, H., CORMIER, M., POMMEPUY, M. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 5, p. 1794–1800, 1997.

DUQUERROY, S., DA COSTA, B., HENRY, C., VIGOUROUX, A., LIBERSOU, S., LEPAULT, J., NAVAZA, J., DELMAS, B., REY, F. A. The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. **EMBO. J.**, v. 28, n. 11, p. 1655–1665, 2009.

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.

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

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

ESTES, M.K., KAPIKIAN, A.Z. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M., HOWLEY, P. M., GRIFFIN, D. E (eds). **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2007, p.1917-1974.

FAEPA. Federação da Agricultura e Pecuária do Pará. AVEFEST 2011 é sucesso. 2012. Disponível em: <<http://www.faeapanet.com.br>>. Acesso em: 09/06/2012.

FOLHA WEB. Agronegócio cresce o dobro da economia. 2012. Disponível em: <[http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticias/agronegocio\\_cresce\\_o\\_dobro\\_da\\_economia](http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticias/agronegocio_cresce_o_dobro_da_economia)>. Acesso em: 09/06/2012.



FREGOLENTE, M.C.D. **Caracterização genética de picobirnavírus detectados em amostras fecais de diferentes hospedeiros**. 2010. 63fls. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular). Universidade do Estadual de Campinas, Campinas.

FREGOLENTE, M.C.D., CASTRO-DIAS, E., MARTINS, S.S., SPILKI, F.R., ALLEGRETTI, S.M., GATTI, M.S.V. Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. **Virus Research**, v. 143, n. 1, p. 134–136, 2009.

FREGOLENTE, M.C.D., GATTI, M.S.V. Nomenclature proposal for picobirnavirus. **Arch. Virol.**, v. 154, n. 12, p. 1953–1954, 2009.

FURTADO, D.A., TINOCO, I.F.F., do NASCIMENTO, J.W.B., LEAL, A.F., AZEVEDO, M.A. Caracterização das instalações avícolas na mesorregião do agreste paraibano. **Eng. Agríc.**, v. 25, n.3, p.831-840, 2005.

GALLIMORE, C.I., APPLETON, H., LEWIS, D., GREEN, J., BROWN, D.W.G. Detection and characterisation of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human fecal specimens. **J. Med. Virol.**, v. 45, n. 2, p. 135–140, 1995.

GALLIMORE, C.I., LEWIS, D., BROWN, D.W.G. Detection and characterization of a novel bi-segmented doublestranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. **Arch. Virol.**, v. 133, n. 1-2, p. 63–73, 1993.

GANESH, B., BÁNYAI, K., MARTELLA, V., JAKAB, F., MASACHESSI, G., KOBAYASHI, N. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. **Rev. Med. Virol.**, 2012. doi: 10.1002/rmv.

GANESH, B., BANYAI, K., MASACHESSI, G., MLADENOVA, Z., NAGASHIMA, S., GHOSH, S., NATARAJU, S.M., PATIVADA, M., KUMAR, R., KOBAYASHI, N. Genogroup I picobirnavirus in diarrhoeic foals: Can the horse serve as a natural reservoir for human infection? **Veterinary Research**, v .42, n. 17, p.52, 2011b.

GANESH, B., NAGASHIMA, S., GHOSH, S., NATARAJU, S.M., RAJENDRAN, K., MANNA, B., RAMAMURTHY, T., NIYOGI, S.K., KANUNGO, S., SUR, DIPIKA., KOBAYASHI, N., KRISHNAN, T. Detection and molecular characterization of multiple strains of Picobirnavirus causing mixed infection in a diarrhoeic child: Emergence of prototype Genogroup II-like strain in Kolkata, India. **Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.**, v. 2, n. 1, p. 61-72, 2011a.

GANESH, B., NATARAJU, S.M., RAJENDRAN, K., RAMAMURTHY, T., KANUNGO, S., MANNA, B., NAGASHIMA, S., SUR, D., KOBAYASHI, N., KRISHNAN, T. Detection of closely related picobirnaviruses among diarrhoeic children in kolkata: evidence of zoonoses? **infection Genetics and Evolution**, v. 10, n. 4, p. 511–516, 2010.

GARCÍA, D.B., CHAVEZ COLAS, M. Síndrome de Mala Absorción en aves - Malabsorption síndrome in poultry. **Revista electrónica de Veterinaria**, v. 11, n. 12, 2010. Disponível em <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121210.html>> Acesso em 10 de março de 2012.

GATTI, M.S.V., PESTANA DE CASTRO, A.F., FERRAS, M.M.G. Viruses with bi-segmented double-stranded RNA in pig faeces. **Res. Vet. Sci.**, v. 47, n. 3, p. 397–398, 1989.

GEORGIEVA, M.V., JAMBAZOVA, N. Serological surveys on broiler breeder flocks for antibodies against chicken infectious anaemia virus and avian reoviruses. **Institute of Experimental Pathology and Parasitology**, v.40, n.6, p.84-86, 2003.

GHOSH, S., KOBAYASHI, N., NAGASHIMA, S., NAIK, T.N. Molecular characterization of full-length genomic segment 2 of a bovine picobirnavirus (PBV) strain: evidence for high genetic diversity with genogroup I PBVs. **Journal of General Virology**, v. 90, n. 10, p. 2519–2524, 2009.

GIBBONS, T.F., STOREY, S.M., WILLIAMS, C.V., MCINTOSH, A., MITCHEL, D.M., PARR, R.D., SCHROEDER, M.E., SCHROEDER, F., BALL, J.M. Rotavirus NSP4: Cell type-dependent transport kinetics to the exofacial plasma membrane and release from intact infected cells. **Virology Journal**, v. 8, p. 278, 2011.

GIORDANO, M.O., MARTINEZ, L.C., MASACHESSI, GISELA., BARRIL, P.A., FERREYRA, L.J., ISA, M.B., VALLE, M.C., MASSARI, P.U., NATES, S.V. Evidence of closely related picobirnavirus strains circulating in humans and pigs in Argentina. **Journal of Infection**, v. 62, n. 1, p. 45-51, 2011.

GOLDENBERG, D., PASMANIK-CHORC, M., PIRAKD, M., KASSD, N., LUBLINE, A., YEHESEKELC, A., HELLERF, D., PITCOVSKIA, J. Genetic and antigenic characterization of sigma C protein from avian reovirus. **Av. Pathol.**, v. 39, n. 3, p. 189-199, 2010.

GOUVEA, VERA S., THOMAS J. SCHNITZER. Polymorphism of the Migration of Double-Stranded RNA Genome Segments of Avian Reoviruses. **Journal of Virology**, v. 43, n. 2, p. 465-471, 1982.

GREEN, J., GALLIMORE, C.I., CLEWLEY, J.P. Genomic characterisation of the large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobirnavirus of *Cryptosporidium parvum*. **Archives of Virology**, v. 144, n. 12, p. 2457–2465, 1999.

GUSMÃO, R.H., MASCARENHAS, J.D.P., GABBAY, Y.B., LINHARES, A.C. Nosocomial transmission of an avian-like rotavirus strain among children in Belém, Brazil. **J. Diarrhoeal Dis Res.**, v. 12, n. 2, p. 129-132, 1994.

HAGA, I.R., MARTINS, S.S., HOSOMI, S.T., VICENTINI, E., TANAKA. H., GATTI. M.S.V. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **Vet. J.**, v. 158, n. 3, p. 234–236, 1999.

HAMZA, I.A., JURZIK, L., UBERLA, K., WILHELM, M. Evaluation of pepper mild mottle virus, human picobirnavirus and Torque teno virus as indicators of fecal contamination in river water. **Water Research**, v. 45, n. 3, p. 1358 -1368, 2011.

HYSER, J.M., COLLINSON-PAUTZ, M.R., UTAMA, B., ESTES, M.K. Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroporin Activity. **MBio**, v. 1, n. 5, 2010. doi:10.1128/mBio.00265-10.

IRVING, L.G., SMITH, F.A. One-year survey of enteroviruses, adenoviruses, and reoviruses isolated from effluent at an activated-sludge purification plant. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 41, n. 1, p. 51–59, 1981.

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, n. 1, p. 233-237, 2009.

ITO, H., SUGIYAMA, M., MASUBUCHI, K., MORI, Y., MINAMOTO, N. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. **Virus Res.**, v. 75, n. 2, p. 123–138, 2001.

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

JINDAL, N; PATNAYAK, D.P; CHANDER, Y; ZIEGLER, A.F; GOYAL, S.M. Detection and molecular characterization of enteric viruses from poult enteritis syndrome in turkeys. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 217-226, 2010b.

JINDAL, N., PATNAYAK, D.P., ZIEGLER, A.F., LAGO, A., GOYAL, S.M. Experimental reproduction of poult enteritis syndrome: Clinical findings, growth response, and microbiology. **Poul. Sci.**, v. 88, n. 1, p. 949-958, 2009.

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.

JOKLIK, W.K. Structure and Function of the Reovirus Genome. **Microbiological Reviews**, v. 45, n. 4, p. 483-501, 1981.

JONES, R.C. Avian reovirus infections. **Rev. Sci. Tech.** v. 19, n. 2, p. 614–625, 2000.

JONES, R.C., GEORGIU, K. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: the influence of age at infection. **Avian Pathology**, v. 13, n. 3, p. 441-457, 1984.

JONES, S.L., BLIKSLAGER, A.T. Role of the enteric nervous system in the pathophysiology of secretory diarrhea. **J. Vet. Intern. Med.**, v.16, n. 3, p.222-228, 2002.

KAPIKIAN, A.Z., HOSHINO, Y., CHANOCK, R.M. Rotaviruses. In: KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., GRIFFIN, D.L., MARTIN, M. A., ROIZMAN, B., STRAIS, E (eds). **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 of avian rotavirus prevailing in Bangladesh. **Bangl. J. Vet. Med.**, v. 5, n. 1-2, p. 43-48, 2007.

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.

KIRKWOOD, C.D., GENTSCH, J.R., GLASS, R.I. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. **Virus Genes.**, v. 19, n. 2, p. 113-122, 1999.

KIRKWOOD, C.D, PALOMBO, E.A. Genetic characterization of the rotavirus nonstructural protein, NSP4. **Virology**, v. 236, n. 2, p. 258-265, 1997.

LABGEO. Laboratório de Geoprocessamento do Instituto Evandro Chagas. Mapa Cartográfico da Mesorregião Metropolitana de Belém. 2012.

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.

LEITE, J.P.G., MONTEIRO, S.P., FIALHO, A. M., PEREIRA, H.G. A novel avian vírus with trisegmented double-stranded RNA and further observations on previously described similar viruses with bisegmented genome. **Virus Res.**, v. 16, n. 2, p.119–126, 1990.

LIMA, K.R.S., ALVES, J.A.K., ARAÚJO, C.V., MANNO, M.C., de JESUS, M.L.C., FERNANDES, D.L., TAVARES, F. Avaliação do ambiente térmico interno em galpões de frango de corte com diferentes materiais de cobertura na mesorregião metropolitana de Belém. **Rev. ciênc. agrár.**, n. 51, p.37-50, 2009.

LIN, S.L., TIAN, P. Detailed computational analysis of a comprehensive set of group A rotavirus NSP4 proteins. **Vírus Gen.**, v. 26, n. 3, p. 271-282, 2003.

LINHARES, A.C. Epidemiologia das infecções por rotavirus no Brasil e os desafios para o seu controle. **Cad. Saúde Pública**, v. 16, n. 3, p. 629-646, 2000.

LOJKIĆ, I., BIDIN, M., BIDIN, Z., MIKEC, M. Viral Agents Associated with Poultry Enteritis in Croatian Commercial Turkey Flocks. **ACTA VET. BRNO**, v. 79, p. 91–98, 2010.

LUDERT, J.E., HIDALGO, M., GIL, F., LIPRANDI, F. Identification in porcine faeces of a novel virus with bi-segmented double-stranded RNA genome. **Arch. Virol.**, v. 117, n. 1-2, p. 97–107, 1991.

MANNO, M.C., LIMA, K.R.S., AGUILAR, C.A.L., SOUZA, N.S.S., BARATA, Z.R.P., VIANA, M.A.O. Production of ammonia inside poultry houses with environmental changes. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 54, p.153-158, 2011.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 193**: Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola. Brasília, 19 de setembro de 1994.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº 44**: Aprova as Normas Técnicas para o controle e a Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas para a Micoplasmose Aviária (*Mycoplasma gallisepticum*, *synoviae* e *melleagridis*). Brasília, 23 de agosto de 2001.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº 32**: Aprova as Normas Técnicas de Vigilância para a doença de Newcastle e Influenza Aviária, e de controle e erradicação para a doença de Newcastle. Brasília, 13 de maio de 2002.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa SDA nº 78**: Aprova as Normas Técnicas para o controle e a Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e livres ou controlados para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. Brasília, 3 de novembro de 2003.

MARSCHANG, R.E. Viruses Infecting Reptiles. **Viruses**, 3, 2087-2126, 2011, doi:10.3390/v3112087.

MARTELLA, V., BÁNYAI, K., MATTHIJNSSENS, J., BUONAVOGLIA, C., CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Vet. Microbiol.**, v. 140, n. 3-4, p. 246–255, 2010.

MARTÍNEZ, L.C., GIORDANO, M.O., ISA, M.B., ALVARADO, L.F., PAVAN, J.V., RINALDI, D., NATES, S.V. Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobirnavirus. **Intervirology**, v. 46, n. 4, p. 207–213, 2003.

MARTÍNEZ, L.C., MASACHESSI, G., CARRUYO, G., FERREYRA, L.J., BARRIL, P. A., ISA, M.B., GIORDANO, M.O., LUDERT, J.E., NATES, S.V. Picobirnavirus causes persistent infection in pigs. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 984–988, 2010.

MARTÍNEZ-COSTAS, J., GÓNZALEZ-LÓPEZ, C., VAKHARIA, V.N., BENAVENTE, J. Possible involvement of the double-stranded RNA-binding core protein sigma in the resistance of avian reovirus to interferon. **J. Virol.**, v. 74, n. 3, p. 1124–1131, 2000.

MASACHESSI, G., MARTÍNEZ, L. C., GIORDANO, M. O., BARRIL, P. A., ISA, B. M., FERREYRA, L., VILLAREAL, D., CARELLO, M., ASIS, C., NATES, S. V. Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. **Arch. Virol.**, v. 152, n. 5, p. 989–998, 2007.

MASCARENHAS, J. D. P., LEITE, J. P. G., LIMA, J. C., HEINEMANN, M. B., OLIVEIRA, D. S., ARAÚJO, I. T., SOARES, L. S., GUSMÃO, R. H. P., GABBAY, Y. B., LINHARES, A. C. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin. **J. Med. Microbiol.**, v. 56, n. 4, p. 524-532, 2007a.

MASCARENHAS, J. D. P., LINHARES, A. C., GABBAY, Y. B., LIMA, C. S., GUERRA, S. F. S., SOARES, L. S., OLIVEIRA, D.S., LIMA, J.C., MACEDO, O.,

LEITE, J.P.G. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. **Virus Research**, v. 126, n. 1-2, p. 149-158, 2007b.

MATTHIJNSSENS, J., M, CIARLET., RAHMAN, M., ATTOUI, H., BÁNYAI, K., ESTES, M.K., GENTSCH, J.R., ITURRIZA-GÓMARA, M., KIRKWOOD, CARL., MARTELLA, V., MERTENS, P.P.C., NAKAGOMI, O., PATTON, J.T., RUGGERI, F.M., SAIF, L.J., SANTOS, NORMA., STEYER, A., TANIGUCHI, K., DESSELBERGER, U., RANST, M.V. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch. Virol.**, v. 153, n. 8, p. 1621–1629, 2008.

McNULTY, M.S., ALLAN, G.M., McCRACKEN, R.M. Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. **Avian Pathol.**, v. 12, n. 1, p. 45–54, 1983.

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

McNULTY, M.S., TODD, D., ALLAN, G.M., McFERRAN, J.B., GREENE, J.A. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups. **Arch. Virol.**, v. 81, n, 1-2, p. 113–121, 1984.

MORI, Y., BORGAN, M.A., ITO, N., SUGIYAMA, M., MINAMOTO, N. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4 derived from group A avian rotaviruses. **Vir. Res.**, v. 89, n. 1, p. 145-151, 2002.

NAKAGOMI, O., NAKAGOMI, T. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. **Arch Virol.**, v.120, n. 1-2, p. 43-55, 1991.

NEJMEDDINE, M., TRUGNAN, G., SAPIN, C., KOHLI, E., SVENSSON, L., LOPEZ, S., COHEN, J. Rotavirus spike protein VP4 is present at the plasma membrane and is associated with microtubules in infected cells. **J. Virol.**, v. 74, n. 7, p. 3313-3320, 2000.

NI, Y., KEMP, M. A comparative study of avian *Orthoreovirus* pathogenicity: virus spread and replication and induction lesions. **Av. Dis.**, v. 39, n. 3, p. 554-566, 1995.

NITURE, G.S., KARPE, A.G., PRASAD, M., BHONSLE, A.V., PATIL, S.V. Detection of group D Avian Rotaviruses among Layer Poultry from Western India. **International Journal of Poultry Science**, v. 9, n. 1, p. 72-76, 2010.

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.** v. v. 156, n. 1-2, p. 8-15, 2012.

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). **Av. Dis.**, v. 50, n. 3, p. 411– 418. 2006.

PAGER, C.T., ALEXANDER, J.J., STEELE, A.D. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8\*, and VP7 genes. **J. Med. Virol.**, v. 62, n. 2, p. 208-216, 2000.

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 Diseases**, v. 52, n. 2, p. 235–244, 2008.

PANTIN-JACKWOOD, M. J., SPACKMAN, E., DAY, J. M. Pathology and virus tissue distribution of Turkey origin reoviruses in experimentally infected turkey poult. **Vet. Pathol.**, v. 44, n. 2, p. 185–195. 2007a.

PANTIN-JACKWOOD, M.J., SPACKMAN, E., DAY, J.M., RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. **Av. Dis.**, v. 51, p. 674-80, 2007b.

PARASHAR, U.D., BRESEE, J.S., GENTSCH, J.R., GLASS, R.I. Rotavirus. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 4, n. 4, p. 561-570, 1998.

PAULILO, M. I. S. **Produtor e Agroindústria: Consensos e Dissensos. O caso de Santa Catarina.** Ed. da UFSC. Florianópolis-RS, 1990.

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.

PEREIRA, H.G., FLEWETT, T.H., CANDEIAS, J.A.N., BARTH, O.M. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. **J. Gen. Virol.**, v. 69, n. 11, p. 397–398, 1988.

POLANCO, G, GONZÁLEZ, M., MANZANO, L., CÁMARA, J., PUERTO, M. Rotavirus em animais assintomáticos: Detecção y clasificación antigénica. **Arch. Med. Vet.**, v. 36, n. 1, 2004, doi: 10.4067/S0301-732X2004000100007.

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.

RECK, C. **Detecção de *Mycoplasma synoviae* e *Orthoreovírus* aviário em lesões de artrites em frangos e matrizes de corte.** 2011. 69fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages.

REVOLLEDO, R., FERREIRA, A.J.P. **Patologia Aviária.** Barueri: Manole, 2009. 510p.

ROSEN, B.I., FANG, Z.Y., GLASS, R.I., MONROE, S.S. Cloning of human Picobirnavirus genomic segments and development of and RT-PCR detection assay. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 316–329, 2000.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia-UFMG, 1998. 221p.

SANTOS, N.S.O., SOARES, C.C. Víroses Entéricas. In: SANTOS, N.S.O., ROMANOS, M.T.V., WIGG, M.D (Eds). **Introdução à Virologia Humana**. 2ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.145-160.

SECRETARIA EXECUTIVA DE ESTADO DE PLANEJAMENTO, ORÇAMENTO E FINANÇAS. **Mesoregião Metropolitana de Belém**. 2006. Disponível em: <<http://www.pa.gov.br>> . Acesso em: 16/09/2006.

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.

SILVA, L.C. **Detecção da infecção de rotavírus e levantamento soropidemiológico de alguns patógenos com potencial zoonótico em avestruzes (*Struthio camelus*) no Estado do Paraná**. 2006. 159f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses). Universidade de São Paulo. São Paulo.

SILVESTRI, L.S., M. TORTORICI, A., VASQUEZ-DEL CARPIO, R., PATTON, J.T. Rotavirus Glycoprotein NSP4 Is a Modulator of Viral Transcription in the Infected Cell. **Journal of Virology**, v. 79, n. 24, p. 15165–15174, 2005.

SPANDIDOS, D.A., GRAHAM, A.F. Physical and chemical characterization of an avian reovirus. **J. Virol.**, v. 19, n. 3, p. 968–976, 1976.

SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS. **Picobirnaviridae**. **Molecular Biology**, 2008. Disponível em: <<http://expasy.org/viralzone>>. Acesso em: 23/02/2011.

SYMONDS, E.M., GRIFFIN, D.W., BREITBART, M. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75 , n. 5, p. 1402–1409, 2009.

TAMEHIRO, C.Y., ALFIERI, A.F., MEDICI, C., AFIERI, 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.

TAYLOR, J.A., O'BRIEN, J.A., YEAGER, M. The cytoplasmic tail of NSP4, the endoplasmic reticulum-localized non-structural glycoprotein of rotavirus, contains distinct virus binding and coiled coil domains. **EMBO J.**, v. 15, p. 4469-4476, 1996.

THEIL, K. W., SAIF, Y.M. Age-related infections with rotavirus, rotaviruslike vírus, and atypical rotavirus in turkey flocks. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 2, p. 333-337, 1987.



TROJNAR, E., OTTO, P., JOHNE, R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Viol.**, v. 386, n. 2, p. 325–333, 2009.

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. **J. Virol.**, v. 84, n. 19, p. 10254–10265, 2010.

UBA. União Brasileira de Avicultura. **Protocolo de Bem-Estar para frangos e perus**. São Paulo:SP, 2008. 23pgs.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. 2011. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 23/02/2011.

UBABEF. União Brasileira de Avicultura. Acompanhe as exportações avícolas brasileiras dados consolidados. Informe UBABEF, ano 1/número 9. Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em: 23/02/2012

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, p. 123–127, 2011.

VAN LEEUWEN, M., WILLIAMS, M.M. W., KORAKA, P., SIMON, J.H., SMITS, S.L., OSTERHAUS, A.D.M.E. Human Picobirnaviruses Identified by Molecular Screening of Diarrhea Samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 5, p. 1787–1794, 2010.

VASCONCELOS, S.B.S., BOTTINO, J.A., GUERRA, J.L., JEREZ, J.A. Lesões articulares em frangos de corte (*Gallus gallus*) na infecção experimental pelo reovírus aviário. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 38, n. 2, p. 80-83, 2001.

VÁZQUEZ-IGLESIAS, L., LOSTALÉ-SEIJO, I., MARTÍNEZ-COSTAS, J., BENAVENTE, J. Avian Reovirus SigmaA Localizes to the Nucleolus and Enters the Nucleus by a Nonclassical Energy- and Carrier-Independent Pathway. **Journal of Virology**, v. 83, n. 19, p. 10163–10175, 2009.

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.

WAKUDA, M., PONGSUWANNA, Y., TANIGUCHI, K. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. **J. Virol. Methods.**, v. 126, n. 1-2, p. 165–169, 2005.

WANG, Y., TU, X., HUMPHREY, C., MCCLURE, H., JIANG, X., QIN, C., GLASS, R.I., JIANG, B. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. **J. Med. Primatol.**, v. 36, n. 2, p. 101–107, 2007.

WANI, S.A., BHAT, M.A., ISHAQ, S.M., ASHRAFI, M.A., BUCHH, A.S., HAQ, M. Detection of a mammalian-like group A rotavirus in diarrhoeic chicken. **Vet. Microbiol.**, v. 94, n. 1, p. 13-18, 2003.

WARD, R. L., BERNSTEIN, D.I., YOUNG, E.C., SHERWOOD, J.R., KNOWLTON, D.R., SCHIFF, G.M. Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection. **J. Infect. Dis.**, v.154, n. 5, p.871-880, 1986.

WILCOX, G.E., ROBERTSON, M.D., LINES, A.D. Adaptation and characteristics of replication of a strain of avian reovirus in Vero cells. **Avian Pathology**, v. 14, n. 3, p. 321-328, 1985.

WILHELMI, I., ROMAN, E., SÁNCHEZ-FAUQUIER, A. Viruses causing gastroenteritis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 9, n. 4, p. 247-262, 2003.

WONG, A.H., CHENG, P.K.C., LAI, M.Y.Y., LEUNG, P.C.K., WONG, K.K.Y., LEE, W.Y., LIM, W.W.L. Virulence Potential of Fusogenic Orthoreoviruses. **Emerg Infect Dis.**, v. 18, n. 6, p. 944–948, 2012.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Specimen receipt and processing. In: **Polio Laboratory Manual**. 4<sup>th</sup> edition. Geneva:WHO. 2004, pg 72-73.

XU, W., PATRICK, M.K., HAZELTON, P.R., COOMBS, K.M. Avian reovirus temperature-sensitive mutant *tsA12* has a lesion in major core protein  $\sigma A$  and is defective in assembly. **J. Virol.**, v. 78, n. 20, p. 11142–11151, 2004.

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.

YIN, H.S., SHIEN, J.H., LEE, L.H. Synthesis in *Escherichia coli* of avian reovirus core protein  $\sigma A$  and its dsRNA-binding activity. **Virology**, v. 266, n. 1, p. 33–41, 2000.

ZHANG, M., ZENG, C.Q.-Y., MORRIS, A.P., ESTES, M.K. A Functional NSP4 Enterotoxin Peptide Secreted from Rotavirus-Infected Cells. **Journal of Virology**, v. 74, n. 24, p. 11663–11670, 2000.

ZHANG, M., ZENG, C.Q., DONG, Y., BALL, J.M., SAIF, L.J., MORRIS, A.P., ESTES, M.K. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. **J. Virol.**, v. 72, n. 5, p. 3666-3672, 1998.

ZHANG, Y., LIU, M., SHUIDONG, O., HU, Q.L., GUO, D.C., CHEN, H.Y., HAN, Z. Detection and identification of avian, duck, and goose reoviruses by RT-PCR: goose and duck reoviruses are part of the same genogroup in the genus *Orthoreovirus*. **Arch. Virol.**, v. 151, p. 1525-1538, 2006.

## ANEXO A – ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Parecer nº 0011/2007/CEPAN/TEC/S VS: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/TEC

## APÊNDICE A - 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

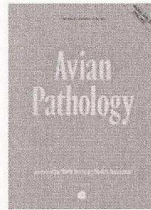
Ciente das informações acima, aceito por minha livre e espontânea vontade, incluir minha granja nesta pesquisa

\_\_\_\_\_, PA \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do responsável pela granja

**APÊNDICE B – ARTIGO SUBMETIDO**

## Avian Pathology



**Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples  
of broiler chickens in Amazon region, Brazil.**

Journal:	<i>Avian Pathology</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, René; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório de Diagnóstico Animal Bezerra, Delana; Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia Kaiano, Jane; Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia Manno, Maria; Universidade Federal Rural da Amazônia, Oliveira, Darleise; Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia Sagica, Fernanda; Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia Gabbay, Yvone; Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia Chaves, Silvío; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Silva, Artur; Universidade Federal do Pará, Alfieri, Amauri; Universidade Estadual de Londrina, Mascarenhas, Joana; Instituto Evandro Chagas, Seção de Virologia
Keywords:	avian rotavirus, molecular epidemiology, phylogenetic analysis, NSP4 gene

SCHOLARONE™  
Manuscripts

E-mail: [cavanagh@metronet.co.uk](mailto:cavanagh@metronet.co.uk) URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/cavp>



1 **Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples of broiler chickens in**  
2 **Amazon region, Brazil.**

3 R. R. Silva<sup>1,4</sup>; D. A. M. Bezerra<sup>2,4</sup>; J. H. L. Kaiano<sup>2,4</sup>; M. C. Manno<sup>3</sup>; D. S. Oliveira<sup>2</sup>; F.  
4 E. S. Sagica<sup>2</sup>; Y. B. Gabbay<sup>2</sup>; S. O. C. Chaves<sup>1</sup>; A. L. C. Silva<sup>4</sup>; A. A. Alfieri<sup>5</sup>; J. D. P.  
5 Mascarenhas<sup>2,\*</sup>.

6 <sup>1</sup>*Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Avenida Almirante Barroso,*  
7 *número 1234, CEP:66093032. LANAGRO, Belém/Pará, Brasil*

8 <sup>2</sup>*Seção de virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde,*  
9 *Ministério da Saúde. Rodovia BR-316 km 7, sem número, Levilândia. CEP:67030-000.*  
10 *Ananindeua/Pará, Brasil*

11 <sup>3</sup>*Instituto de Saúde e Produção Animal. Universidade Federal Rural da Amazônia.*  
12 *Avenida Presidente Tancredo Neves, número 2501, CEP: 66.077-901, Belém/Pará,*  
13 *Brasil*

14 <sup>4</sup>*Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical. Avenida Generalíssimo*  
15 *Deodoro, número 92, CEP: 66055-240, Belém/Pará, Brasil*

16 <sup>5</sup>*Universidade Estadual de Londrina. Departamento de Medicina Veterinária*  
17 *Preventiva. Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445 Km 380, CEP: 86051-990,*  
18 *Londrina/Paraná, Brasil*

19

20 Running Head: Avian rotavirus in broiler chickens.

21 \*Corresponding author: Tel: +55 91 32142016; fax: +55 91 32142005.

22 E-mail address: [joanamascarenhas@iec.pa.gov.br](mailto:joanamascarenhas@iec.pa.gov.br) (J. D. P. Mascarenhas)

23

24

25 **Abstract**

26

27

28 The main purpose of this research is to determine the prevalence of the avian  
29 rotavirus (AvRV) by molecular tests in broiler chickens (*Gallus gallus*) of the  
30 Metropolitan mesoregion of Belém (Pará state, Brazil), provide epidemiological  
31 information and compare rotaviruses detected in this study with reference strains by  
32 phylogenetic analysis. Pooled fecal samples were collected from poultries of 37 farms,  
33 and their age varied between one to 45 days. The samples were tested by RT-PCR to  
34 detect the *NSP4* gene. From a total of 85 fecal samples tested, 35 (41.2%) were  
35 positives. Of the 37 farms from this study, 19 (51.4%) had at least one poultry house  
36 with the presence of AvRV. The virus was present in six (75%) of the eight counties  
37 sampled. Two (66.7%) of the three integrator showed farms with the presence of AvRV.  
38 Of the 35 rotavirus-positive samples, 18 (51.4%) were positive in chicks aged 31-45  
39 days. Of the 29 rotavirus-positive samples, 25 (86.2%) were positive in chicks >9  
40 birds/m<sup>2</sup> density. It was also possible to observe the circulation of the virus across both  
41 seasons studied. Twenty samples were selected for sequencing to both confirm the RT-  
42 PCR results and to perform phylogenetic analysis. The rotaviruses detected in our study  
43 clustered in a single group and had 93.5 to 100% sequence identity at the nucleotide  
44 level. The most affected age group included broiler chickens older than 15 days.  
45 Climatic conditions and high population densities favored a greater spread of AvRV and  
46 supported its uniform maintenance between seasons.

46

47 *Key words: avian rotavirus; molecular epidemiology; phylogenetic analysis; NSP4*  
48 *gene*

49

50



51 **Introduction**

52 Infection by some viruses has been associated with poultry enteritis, including  
53 Avian *Rotavirus* (AvRV) (Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2007; Jindal et al.,  
54 2010a), *Astrovirus* (Day et al., 2007; Pantin-Jackwood et al., 2011), *Reovirus* (Pantin-  
55 Jackwood et al., 2007; Goldenberg et al., 2010; Bányai et al., 2011), and *Coronavirus*  
56 (Pantin-Jackwood et al., 2007). Several studies have used molecular methods as main  
57 tools to determine the prevalence and distribution of enteric viruses in poultry industries  
58 due to their high sensitivity and specificity in detecting and identifying viral agents  
59 (Tamehiro et al., 2003; Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2007; Day et al., 2007,  
60 Pantin-Jackwood et al., 2008; Islam et al., 2009; Jindal et al., 2010a).

61 Rotavirus (RV) is mainly associated with diarrhea in human children, other  
62 mammals and birds, and with the latter it has been isolated from chickens, ducks,  
63 pheasants, pigeons and turkeys (McNulty et al., 1979; Takase et al., 1986; Gough et al.,  
64 1992; Legrottaglie et al., 1997; Elschner et al., 2005; Ursu et al., 2011). Several groups  
65 of rotavirus have been isolated from birds, including group A, which has also been  
66 found in other animals (McNulty et al., 1984; Otto et al., 2006; Villarreal et al., 2006;  
67 Savita et al., 2008), and groups D, F and G, which have been designated as uncommon  
68 and have only been found in birds (Otto et al., 2006; Trojnar et al., 2010; Bezerra et al.,  
69 2012).

70 The AvRV has been detected in several countries (McNulty et al., 1979;  
71 Minamoto et al., 1988; Tamehiro et al., 2003; Polanco et al., 2004; Otto et al., 2006;  
72 Pantin-Jackwood et al., 2007; Islam et al., 2009) but we don't have evidence of the  
73 presence of AvRV in the Metropolitan mesoregion of Belém. The objectives of this  
74 study were to determine the prevalence of the AvRV in the Metropolitan mesoregion of  
75 Belém by molecular testing of broiler chickens and to provide further epidemiological

76 information about this virus. Phylogenetic analysis of the rotaviruses detected in this  
77 study was also performed to compare the obtained sequences with reference strains.

78

#### 79 **Materials and methods**

80

81 **Area of study.** The present study was approved by the ethics committee on animal  
82 research of Evandro Chagas Institute with registration number 0004/2007, and it was  
83 conducted in the Metropolitan mesoregion of Belém, Pará state, Brazil. The climate in  
84 this region is hot and humid (tropical wet), with high annual rainfall. The rainy season  
85 occurs between December and May, and the dry season is from June to November, with  
86 an average annual climate temperature of 26°C, 85% relative humidity and 2.870 mm of  
87 precipitation rainfall (Lima et al., 2009).

88

89 **Sample origin and collection.** From August 2008 to May 2011, fecal samples from  
90 poultry litter were collected from 37 commercial chicken flocks belonging to three  
91 integrators, in eight counties of Pará state, Brazil. Nine points were selected at each  
92 poultry house, and in each point, a sampling was performed consisting of one pool per  
93 house. For convenience, pooled samples are referred to simply as “samples”. The age of  
94 these birds range from one to 45 days, and a total of 85 samples were collected in this  
95 period. Three companies agreed to participate and signed a consent form allowing the  
96 sampling. No information about the chickens’ health state was requested. However,  
97 poultry houses were separated by density conditions according to information obtained  
98 in Manno et al. (2011). Therefore, farms were divided into  $\leq 9$  birds/m<sup>2</sup> density and  $>9$   
99 birds/m<sup>2</sup> density. All samples were stored at -20°C until processed.



100

101 **Processing of samples.** A 10% suspension of each sample was prepared in phosphate  
102 buffered saline. The suspension was homogenized, and the homogenate was centrifuged  
103 at 700 g for 10 min.

104

105 **RNA extraction.** Viral RNA was extracted from 300 µl of supernatant of stool  
106 suspension using guanidine isothiocyanate/silica method according to Boom et al.  
107 (1990).

108

109 **Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).** All samples were  
110 analyzed using a set of specific primers targeting the *NSP4* gene of AvRV, which  
111 amplifies a fragment of 642-bp (Trojnar et al., 2009). The RT-PCR was performed in  
112 two steps. In the first step, 3 µl of extracted RNA and 20 mM of each primer were  
113 denatured at 97 °C for 5 min in a thermocycler, followed by an ice bath of 5 min.  
114 Reverse transcription was performed in a final volume of 25 µL containing 16.5 µL of  
115 H<sub>2</sub>O free of RNase and DNase, 2.5 µL of 10x buffer (Invitrogen), 1 µL of dNTPs (10  
116 mM, Invitrogen), 0.75 µL of MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), and 0.25 µL of RT  
117 (SuperScript II, 20U, Invitrogen). The reaction was incubated at 42 °C for 1 hour. PCR  
118 was conducted by adding 25 µL of PCR reagents to the cDNA sample for a final  
119 reaction volume of 50 µL. The PCR reagents included 18.5 µL of H<sub>2</sub>O free of RNase  
120 and DNase, 2.5 µL of 10x buffer (Invitrogen), 3 µL of dNTPs (10 mM, Invitrogen), 0.75  
121 µL of MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen), and 0.25 µL of Taq DNA polymerase (2.5 U/µL,  
122 Invitrogen), with the following cycling conditions: 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C  
123 for 1 min, 50 °C for 1 min, and 72 °C for 2 min, with a final incubation at 68 °C for 7

124 min. The PCR products were analyzed by gel electrophoresis on a 1.5% agarose gel  
125 with TBE buffer, and the gel was stained with SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen).  
126 Visualization of the 642-bp band was conducted using a GEL DOC 1000 instrument.

127

128 **Sequencing.** Samples were selected for sequencing on the basis of PCR product  
129 quantity and epidemiological context to both confirm the RT-PCR results and to  
130 perform phylogenetic analysis. These samples were from thirteen different flocks and  
131 five different counties. Sequence analysis was performed with conventional RT-PCR  
132 products from the initial detection assay. The same samples were purified using the  
133 commercial kit QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), following the protocol  
134 provided by the manufacturer.

135 The purified DNA was subjected to sequencing reaction in both directions, using  
136 a Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems) and an ABI Prism 3130 Genetic  
137 Analyzer (Applied Biosystems). The chromatograms were analyzed, and sequences  
138 were edited using the BioEdit Sequence Alignment Editor (v.7.0.9.1) software. A  
139 phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method using a matrix of  
140 genetic distances established under the Kimura two-parameter model using MEGA  
141 5.05. The robustness of each node was assessed by bootstrap analysis using 2,000  
142 replicates. All sequenced strains were also compared with reference strains available in  
143 the GenBank database. The analysis included a fragment of 632 nucleotides, which  
144 corresponded to nucleotides 35-666 of the *NSP4* gene, using the group A prototype Ch-  
145 02V0002G3 (Accession Number, FJ169862) as reference (Trojnar et al., 2009).

146



147 **Statistical analysis.** The data were analyzed using the Graph pad prism (5.00) software.  
148 Using the Fisher's exact test (significance level of  $P<0.05$ ), samples from different  
149 municipalities, companies, age, population density and season were tested under the  
150 null hypothesis that the presence and absence of the agent are independent of these  
151 variables.

152

153 **GenBank accession numbers.** The rotavirus nucleotide sequences presented in this  
154 article have been submitted to GenBank under accession numbers JN374834 to  
155 JN374838 and JX474754 to JX474768.

156

## 157 **Results**

158

159 **Epidemiology and statistical analysis.** From a total of 85 fecal samples tested, 35  
160 (41.2%) were positive for AvRV. Of the 37 farms studied, 19 (51.4%) had at least one  
161 poultry house with the presence of AvRV. The virus was present in six (75%) of the  
162 eight counties sampled. The highest prevalence was found in Belém, Santa Bárbara and  
163 Santa Isabel. Intermediate prevalence was found in Benevides, Inhangapi and  
164 Castanhal. There was no detection in Ananindeua and Santo Antônio do Tauá (Table 1).  
165 Significant differences were observed between Santa Isabel and Castanhal ( $P\leq 0.05$ ),  
166 Santa Isabel and Ananindeua ( $P\leq 0.01$ ), Santa Isabel and Santo Antônio do Tauá  
167 ( $P\leq 0.05$ ), Castanhal and Belém ( $P\leq 0.05$ ), Ananindeua and Belém ( $P\leq 0.01$ ),  
168 Ananindeua and Santa Bárbara ( $P\leq 0.05$ ), Belém and Santo Antônio do Tauá ( $P\leq 0.05$ )  
169 and Santa Bárbara and Santo Antônio do Tauá ( $P\leq 0.05$ ). All ages and population  
170 densities were positive for AvRV. Of the 35 rotavirus-positive samples, 18 (51.4%)

171 were positive in chicks of 31-45 days (Table 2). Of the 29 rotavirus-positive samples  
172 with density information, 25 (86.2%) were positive in chicks >9 birds/m<sup>2</sup> density (Table  
173 3). There was statistically significant differences between the frequencies observed  
174 across age groups ( $P \leq 0.01$ ): significant differences were observed between 0-15 and 16-  
175 30 days ( $P \leq 0.05$ ) and between 0-15 and 31-45 days ( $P \leq 0.05$ ), while no statistically  
176 significant differences were observed between 16-30 and 31-45 days ( $P > 0.05$ ).  
177 Significant differences were observed between densities of  $\leq 9$  and  $> 9$  birds/m<sup>2</sup>  
178 ( $P \leq 0.05$ ). Two (66.7%) of the three integrators showed farms with the presence of  
179 AvRV (Table 4). It was also possible to observe the circulation of the virus across both  
180 seasons studied (Table 5). There was no statistically significant difference in the  
181 frequencies observed between the companies ( $P > 0.05$ ) and seasons ( $P > 0.05$ ) studied.

182

183 **Phylogenetic analysis.** The PCR products from 20 rotavirus-positive cases were  
184 sequenced and compared with previously published sequences. Rotaviruses from this  
185 study were phylogenetically related to previously reported rotaviruses from Germany  
186 (02V0002G3), Ireland (Ch-1), United States of America (AR/SEP-840; NC/SEP-839)  
187 and Brazil (USP336-13), although they were in a separate group. However, AvRV from  
188 the Metropolitan mesoregion of Belém was unrelated to turkey rotaviruses from the  
189 Ireland (Ty-1) and United States of America (NC/SEP-833; MN-SEP-808) and the  
190 pigeon rotavirus from Japan (PO-13). Of the 20 rotaviruses isolated in the present study,  
191 19 were phylogenetically close to each other, and only one (AVE83/2010) clustered in a  
192 separate clade (Figure 1). The AvRV of this study had 93.5 to 100% shared sequence  
193 identity at the nucleotide level and 93.4 to 100% at the amino acid level. A comparison  
194 with chicken sequences already published demonstrated a shared identity of 86.3 to  
195 90.5% at the nucleotide level and 83.2 to 91.8% at the amino acid level. When chicken



196 rotaviruses were compared with previously published turkey rotaviruses, the sequence  
197 homology was 67.2 to 73% and 73.1 to 78.3% at the nucleotide and amino acid levels,  
198 respectively. Amino acid analysis corresponding to positions 1 to 169 of the *NSP4*  
199 protein 02V0002G3 revealed some changes in isolated residues M18I, I43L, R51S,  
200 V97I/M, N142T, E146G, E153D and S156N when compared with the samples of our  
201 study and the prototype (Figure 2).

202

### 203 Discussion

204 The RT-PCR positivity (41.2%) obtained in this study was lower than that  
205 described by Pantin-Jackwood et al. (2007) in healthy commercial turkeys (67.7%)  
206 using the same methods and gene with different primers. Subsequently, Jindal et al.  
207 (2010a) found lower results (30.6%) when testing fecal samples from breeder turkeys  
208 by RT-PCR, using the *NSP4* gene and primer used by Pantin-Jackwood et al. (2007).  
209 Pantin-Jackwood et al. (2008) detected AvRV in 46.5% of the commercial chickens  
210 flocks studied by RT-PCR targeting the *NSP4* gene. In this study, we also detected  
211 AvRV by RT-PCR in a high number of flocks (51.4%) using primers targeting the  
212 *NSP4* gene described by Trojnar et al. (2009). According to Karim et al. (2007), these  
213 differences in results may be due to some factors such as geoclimatic situation, strain  
214 virulence, simultaneous infection with different AvRV serotypes or even with other  
215 enteropathogens, biosecurity and management failures.

216 The prevalence of AvRV infection in the studied counties ranged from 0%  
217 (Ananindeua and Santo Antônio do Tauá) to 80% (Belém), showing significant  
218 variation of the spread of the virus with the studied region (Table 1). Similar findings  
219 were reported by Karim et al. (2007), who observed that the prevalence of AvRV

220 infection in chicken showed significant variation across different districts. In this study,  
221 the presence of an area with high AvRV prevalence represented by Belém, Santa  
222 Bárbara and Santa Isabel can be explained by the fact that there is a high concentration  
223 of farms in this area. Thus, distances between farms are smaller, and possibly even with  
224 the adoption of prophylactic measures by the owner, the risk of dissemination of  
225 infectious agents will remain large. However, in the area where there was a lower  
226 prevalence of AvRV represented by Santo Antônio do Tauá and Ananindeua, there is a  
227 low concentration of farms. Therefore, further investigation of both the regional density  
228 of poultry farms and farm management as risk factor for the spread of infectious agents  
229 would help to clarify the main statistical differences found among the counties studied.

230 MacNulty et al. (1983) described that the AvRV is not normally excreted in  
231 feces of chickens less than 14 days of age because of probable modulation in passive  
232 immunity of maternal origin. Subsequently, MacNulty et al. (1984) suggested that the  
233 establishment of AvRV in some age groups may occur by factors such as susceptibility  
234 of the younger animals to AvRV, level of passive immunity, infectious dose, differences  
235 in farm management and stressful conditions. When studying the presence of rotavirus  
236 in birds, Pantin-Jackwood et al. (2008), Islam et al. (2009) and Jindal et al. (2010a)  
237 found chicks up to 15 days of age to be the most affected age group, with infection  
238 frequencies ranging from 37.3 to 45%. Our results identified AvRV by RT-PCR in  
239 48.6% of samples from chicks 16 to 30 days of age. The higher occurrence of rotavirus  
240 in broiler chickens over 15 days of age observed in this study is not consistent with  
241 results obtained by literature, and the factors described above can help explain the  
242 differences observed.

243 Greater numbers of positive test outcomes indicating AvRV were observed in  
244 animals subjected to the highest population densities, with statistically significant



245 differences in the incidences among animals subjected to low densities (Table 3).  
246 According Manno et al. (2011), high densities of chickens can lead to health problems.  
247 The high density of birds probably facilitated the circulation of AvRV between farms  
248 with higher densities ( $> 9$  birds/m<sup>2</sup>) and impaired it between farms with lower densities  
249 ( $\leq 9$  birds/m<sup>2</sup>).

250 The mesoregion studied is the largest producer of broilers in the Pará state.  
251 Although a number of different companies are developing commercial activities in this  
252 area, in some cases, the same company may acquire inputs on behalf of farms that use  
253 different suppliers. In addition, one supplier can supply two or more companies with  
254 their products (genetic material, poultry litter, feed, etc). These facts may explain the  
255 lack of significant difference in infection frequencies found between the three  
256 companies participating in our study (Table 4).

257 Seasonality is a characteristic of many diseases and may vary according on the  
258 agent under study. According to Linhares (2000), the seasonal distribution of rotavirus  
259 gastroenteritis in Brazil displays a marked seasonal profile, with a higher incidence in  
260 temperate regions of the country during the driest months. The Pará state region has a  
261 significant incidence of childhood diarrhea by rotavirus during months of low rainfall.  
262 In chickens, Barrios et al. (1991) found a uniform seasonal distribution of the rotavirus  
263 between studied seasons. Karim et al. (2007) detected the highest percentage of  
264 rotavirus positives in chicken fecal samples in the summer season. We did not find  
265 significant differences between studied seasons. The uniform seasonal distribution of  
266 the rotavirus found in this study may be related to climatic conditions of the region in  
267 which there is no large variation in temperature and humidity throughout the seasons.

268           The close association of rotaviruses with previously published rotaviruses may  
269 indicate that rotaviruses may cluster based on geographic locations (Pantin-Jackwood et  
270 al., 2008; Jindal et al., 2010b). Although rotaviruses from this study have been  
271 phylogenetically related to previously reported chicken rotavirus from Germany,  
272 Ireland, United States of America and Brazil, phylogenetic analysis showed that *NSP4*  
273 gene sequences of the rotavirus from this study clustered in a separate group, showing a  
274 regionalization of these samples. However, there were no additional geographical  
275 patterns and/or genetic factors suggesting the existence of different genetic groups or  
276 variants. Pantin-Jackwood et al. (2007) also studied the *NSP4* gene and found four  
277 different groups and several variants of AvRV in commercial turkeys. These authors  
278 concluded that the identification of numerous viral types and genetic variations within a  
279 single flock over time is probably not a result of divergent adaptation to differing  
280 conditions across farms or flocks but is instead due to the chance detection of one  
281 variant instead of another.

282           The possibility of interspecies transmission and reassortment among group A  
283 avian rotaviruses has been reported by Schumann et al. (2009). Our results  
284 demonstrated assortment of chicken rotaviruses in a separate group from that of turkey  
285 rotaviruses, indicating agreement with the observations made by Jindal et al. (2010b)  
286 that indicate interspecies transmission of rotaviruses may not be a common  
287 phenomenon.

288           In complete ORF analysis, Matthinjssens et al. (2008) recommends that if  
289 pairwise nucleotide identities between the gene of the novel strain under investigation  
290 and strains belonging to an established genotype A are above the cut off value (85% for  
291 *NSP4* gene) of that gene segment, the strain under study can be assigned to genotype A.  
292 The samples of the present study had 87.5 to 89.3% sequence identity at the nucleotide



293 level when compared with the prototype E10 (02V0002G3), which leads us to deduce  
294 that all samples submitted to nucleotide sequencing of the *NSP4* gene in this study  
295 could be classified as genotype E10.

296

#### 297 **Conclusions**

298 The circulation of AvRV was confirmed in the Metropolitan mesoregion of  
299 Belém with areas showing high, intermediate and low prevalences. The most affected  
300 age group was broiler chickens older than 15 days. Population densities  $>9$  birds/m<sup>2</sup>  
301 favored a greater spread of AvRV, while climatic conditions supported the uniform  
302 maintenance of group A (genotype E10) AvRV between seasons.

303

#### 304 **Acknowledgements**

305 This study was partially supported by a grant from the Science and Technology  
306 Secretariat of Para State, contract no. 067/2008 (SEDECT/FAPESPA/PA), and  
307 IEC/SVS/MS, Brazil. Delana Andreza Melo Bezerra and Jane Haruko Lima Kaiano  
308 received a Grant fellowship from the Brazilian National Council for the Development of  
309 Science and Technology (CNPq). We would like to thank Euzeni Maria de Fátima  
310 Menezes for excellent technical assistance.

311

#### 312 **References**

313

314 Bányai, K., Dandár, E., Dorsey, K. M., Mató, T. & Palya, V. (2011). The genomic  
315 constellation of a novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting  
316 syndrome in broilers. *Virus Genes*, 42, 82–89.

317

318 Barrios, H., Viora, S., de Franceschi, M. & Fliess, E. (1991). Incidencia de los rotavirus  
319 en establecimientos avícolas de producción intensiva. *Revista Argentina de*  
320 *Microbiología*, 23, 15-21.

321

322 Bezerra, D.A., da Silva, R.R., Kaiano, J.H., Silvestre, R.V., de Souza Oliveira, D.,  
323 Linhares, A. C., Gabbay, Y.B. & Mascarenhas, J.D. (2012). Detection of avian group D  
324 rotavirus using the polymerase chain reaction for the VP6 gene. *Journal of Virological*.  
325 *Methods*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.017>.

326

327 Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-Van Dillen, P.M.E.  
328 & Van Der Noordaa, J. (1990). Rapid and simple method for purifications of nucleic  
329 acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 495-503.

330

331 Day, J. M., Spackman, E. A. & Pantin-Jackwood, M. A. (2007). Multiplex RT- PCR  
332 Test for the Differential Identification of Turkey Astrovirus Type 1, Turkey Astrovirus  
333 Type 2, Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus, and Avian Rotavirus. *Avian*  
*Disease*, 51, 681-684.

334

335 Elschner, M., Hotzel, H., Reetz, J., Diller, R. & Otto, P. (2005). Isolation, identification  
336 and characterization of group A from a chicken: the inner capsid protein sequence  
337 shows only a distant phylogenetic relationship to most other avian group A rotaviruses.  
338 *Journal of Veterinary Medicine*, 52, 211-213.

339

340 Goldenberg, D., Pasmanik-Chorc, M., Pirakd, M., Kassd, N., Lubline, A., Yeheskel,  
341 A., Hellerf, D. & Pitcovski, J. (2010). Genetic and antigenic characterization of sigma C  
342 protein from avian reovirus. *Avian Pathology*, 39, 189-199.

342

343 Gough, R.E., Cox, W.J. & Devoy, J. (1992). Isolation and identification of rotavirus  
344 from racing pigeons. *Veterinary Record*, 130, 273.

345

346 Islam, M.S., Alam, M.M., Ahmed, M.U., Saifuzzaman, A.B.M., Kobayashi, N.,  
347 Kayesh, M.E.H. & Udin, M.S. (2009). Molecular epidemiologic study on rotavirus  
348 infection in human and birds in association with gastroenteritis. *Bangladesh Journal of*  
349 *Veterinary Medicine*, 7, 233-237.

350

351 Jindal, N., Patnayak, D.P., Chander, Y., Ziegler, A.F. & Goyal, S.M. (2010a). Detection  
352 and molecular characterization of enteric viruses in breeder turkeys. *Avian Pathology*,  
353 39, 53-61.

354

355 Jindal, N., Patnayak, D.P., Chander, Y., Ziegler, A.F. & Goyal, S.M. (2010b). Detection  
356 and molecular characterization of enteric viruses from poult enteritis syndrome in  
357 turkeys. *Poultry Science*, 89, 217-226.

358

359 Karim, M.R., Rume, F.I., Alam, M.M. & Ahmed, M.U. (2007). Molecular  
360 epidemiologic study of avian rotavirus prevailing in Bangladesh. *Bangladesh Journal of*  
361 *Veterinary Medicine*, 5, 43-48.

362 Legrottaglie, R., Rizzi, V. & Agrimi, P. (1997). Isolation and identification of avian  
363 rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. *Comparative Immunology,*  
364 *Microbiology and Infectious Diseases*, 20, 205-210.



- 365 Lima, K.R.S., Alves, J.A.K., Araújo, C.V., Manno, M.C., Jesus, M.L.C., Fernandes,  
366 D.L. & Tavares, F. (2009). Inner thermal environment assessment in broiler house with  
367 different roofs materials on the great metropolitan region of Belém. *Revista de Ciências*  
368 *Agrárias*, 51, 37-50.
- 369
- 370 Linhares, A.C. (2000). Rotavirus infection in Brazil: epidemiology and challenges for  
371 control. *Cadernos de Saúde Pública*, 16, 629-646.
- 372 Manno, M.C., Lima, K.R.S., Aguilar, C.A.L., Souza, N.S.S., Barata, Z.R.P. & Viana,  
373 M.A.O. (2011). Production of ammonia inside poultry houses with environmental  
374 changes. *Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 54, 153-158.
- 375 Matthijnsens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K.,  
376 Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C., Martella, V., Mertens, P.P.C.,  
377 Nakagomi, O., Patton, J.T., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi,  
378 K., Desselberger, U. & Van Ranst, M. (2008). Recommendations for the classification  
379 of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of Virology*, 153,  
380 1621–1629.
- 381
- 382 McNulty, M. S., Curran, W. L., Todd, D. & McFerran, J. B. (1979). Detection of  
383 viruses in avian faeces by direct electron microscopy. *Avian Pathology*, 8, 239–247.
- 384
- 385 McNulty, M. S., Allan, G. M. & McCracken, R.M. (1983). Experimental infection of  
386 chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. *Avian Pathology*, 12, 45–54.
- 387

- 388 McNulty, M. S., Todd, D., Allan, G. M., McFerran, J. B. & Greene, J. A. (1984).  
389 Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups.  
390 *Archives of Virology*, 81, 113–121.  
391
- 392 Minamoto, N., Oki, K., Tomita, M., Kinjo, T. & Suzuki, Y. (1988). Isolation and  
393 characterization of rotavirus from feral pigeon in mammalian cell cultures.  
394 *Epidemiology and Infection*, 100, 481–492.  
395
- 396 Otto, P., Liebler-Tenorio, E. M., Elschner, M., Reetz, J., Lohren, U. & Diller, R. (2006).  
397 Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting  
398 and stunting syndrome (RSS). *Avian Disease*, 50, 411–418.  
399
- 400 Pantin-Jackwood, M.J., Spackman, E., Day, J.M. & Rives, D. (2007). Periodic  
401 monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of  
402 astrovirus and rotavirus on the farms. *Avian Disease*, 51, 674–80.
- 403 Pantin-Jackwood, M.J., Day, J.M., Jackwood, M.W. & Spackman, E. (2008). Enteric  
404 Viruses Detected by Molecular Methods in Commercial Chicken and Turkey Flocks in  
405 the United States Between 2005 and 2006. *Avian Diseases*, 52, 235–244.  
406
- 407 Pantin-Jackwood, M.J., Strother, K.O., Mundt, E., Zsak, L., Day, J.M. & Spackman, E.  
408 (2011). Molecular characterization of avian astroviruses. *Archives of Virology*, 156,  
409 235–44.

- 410 Polanco, G., González, M., Manzano, L., Cámara, J. & Puerto, M. (2004). Rotavirus en  
411 animales asintomáticos: Detección y clasificación antigénica. *Archivos de medicina*  
412 *veterinaria*, 36, doi: 10.4067/S0301-732X2004000100007.
- 413 Savita, K.A.L., Malik, Y.P.S. & Minakshi, P.G. (2008). Detection and characterization  
414 of group A and D avian rotaviruses India. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 554-556.  
415
- 416 Schumann, T., Hotzel, H., Otto, P. & Johne, R. (2009). Evidence of interspecies  
417 transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology*, 386, 334–  
418 343.  
419
- 420 Takase, K., Nonaka, F., Sakaguchi, M. & Yamada, S. (1986). Cytopathic avian  
421 rotavirus isolated from duck faeces in chicken kidney cell cultures. *Avian Pathology*,  
422 15, 719–730.
- 423 Tamehiro, C.Y., Alfieri, A.F., Médici, K. C. & Alfieri, A. A. (2003). Segmented  
424 double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. *Brazilian*  
425 *Journal of Microbiology*, 34, 349-353.
- 426 Trojnar, E., Otto, P. & Johne, R. (2009). The first complete genome sequence of a  
427 chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian  
428 strains. *Virology*, 386, 325–333.  
429
- 430 Trojnar, E., Otto, P., Roth, B., Reetz, J. & Johne, R. (2010). The genome segments of a  
431 group D rotavirus possess group A-like conserved termini but encode group-specific  
432 proteins. *Journal of Virology*, 84, 10254-10265.  
433



- 434 Ursu, K., Papp, H., Kisfali, P., Rigó, D., Melegh, B., Martella, V. & Bányai, K. (2011).  
435 Monitoring of Group A Rotaviruses in Wild-Living Birds in Hungary. *Avian Diseases*,  
436 55, 123–127.  
437  
438 Villarreal, L.Y.B., Uliana, G., Valenzuela, C., Chácon, JLV., Saindenberg, A.B.S.,  
439 Sanches, A.A., Brandão, P.E., Jerez, J.A. & Ferreira, A.J.P. (2006). Rotavirus detection  
440 and isolation from chickens with or without symptoms. *Brasilian Journal of Poultry*  
441 *Science*, 3, 187-191.  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471

472  
473 **Table 1.** Detection of AvRV in broiler chicken in different counties by RT-PCR.

Counties	Samples collected	PCR+	PCR-
Belém	5	4 (80%)	1 (20%)
Santa Bárbara	4	3 (75%)	1 (25%)
Santa Isabel	34	20 (58.8%)	14 (41.2%)
Benevides	12	4 (33.3%)	8 (66.7%)
Inhangapi	7	2 (28.6%)	5 (71.4%)
Castanhal	12	2 (16.6%)	10 (83.4%)
Ananindeua	7	0 (0%)	7 (100%)
Santo. Antônio Tauá	4	0 (0%)	4 (100%)
Total	85	35 (41.2%)	50 (58.8%)

474

475

476

477

478

479 **Table 2.** Detection of AvRV in broiler chicken in different ages by RT-PCR

Age	Samples collected	PCR+	PCR-
1-15 days	11	1 (9.1%)	10 (90.9%)
16-30 days	37	16 (43.2%)	21 (56.8%)
31-45 days	37	18 (48.6%)	19 (51.4%)
Total	85	35 (41.2%)	50 (58.8%)

480

481

482

483  
 484 **Table 3.** Detection of AvRV in broiler chicken in different density conditions by RT-  
 485 PCR

Density	Samples collected	PCR+	PCR-
≤9,0 birds/m <sup>2</sup>	20	4 (20%)	16 (80%)
>9 birds/m <sup>2</sup>	52	25 (48.8%)	27 (51.9%)
Total	72*	29 (41.2%)	43 (59.7%)

486  
 487 \*Thirteen samples from five farms did not provide information on the density  
 488 condition.  
 489



490

491

492 **Table 4.** Detection of AvRV in broiler chicken in different integrators by RT-PCR

Integrator	Samples collected	PCR+	PCR-
Company 1	39	14 (35.9%)	25 (64.1%)
Company 2	38	19 (50%)	19 (50%)
Company 3	4	0 (0%)	4 (100%)
Total	81*	33 (40.7%)	48 (59.8%)

493 \*Four samples were from farms without companies.

494

495

496 **Table 5.** Detection of AvRV in broiler chicken in different seasons by RT-PCR

Season	Samples collected	PCR+	PCR-
Rainy season	38	17 (44.7%)	21 (55.3%)
Dry season	47	18 (38.3%)	29 (61.7%)
Total	85	35 (41.2%)	50 (58.8%)

497

498

499 **Figure legends**

500

501 Fig. 1. Phylogenetic tree constructed using the sequence of the non-structural rotavirus  
502 *NSP4* gene amplified from 20 strains from pooled fecal samples. Sequences starting  
503 with AVE are from the present study. The neighbor-joining method and Kimura two-  
504 parameter model were used for phylogenetic reconstruction. Only *bootstrap* values  
505 (2,000 replicates) higher than 70% are indicated in the nodes of the tree. The scale bar is  
506 proportional to the phylogenetic distance. The outgroup sequence 05V0049 (AvRV  
507 group D) was included to better understand the phylogenetic relationships among  
508 strains.

509

510

511 Fig. 2. Differences observed in the alignment of deduced amino acid sequences of *NSP4*  
512 protein for AvRV detected in our study in comparison with the 02V0002G3 prototype.  
513 The number at the top demonstrated the position of the amino acid in the sequence. A  
514 dot indicates amino acid identity with the comparison strain sequence at that position.  
515 CK=Chicken; TK=Turkey; PO=Pigeon

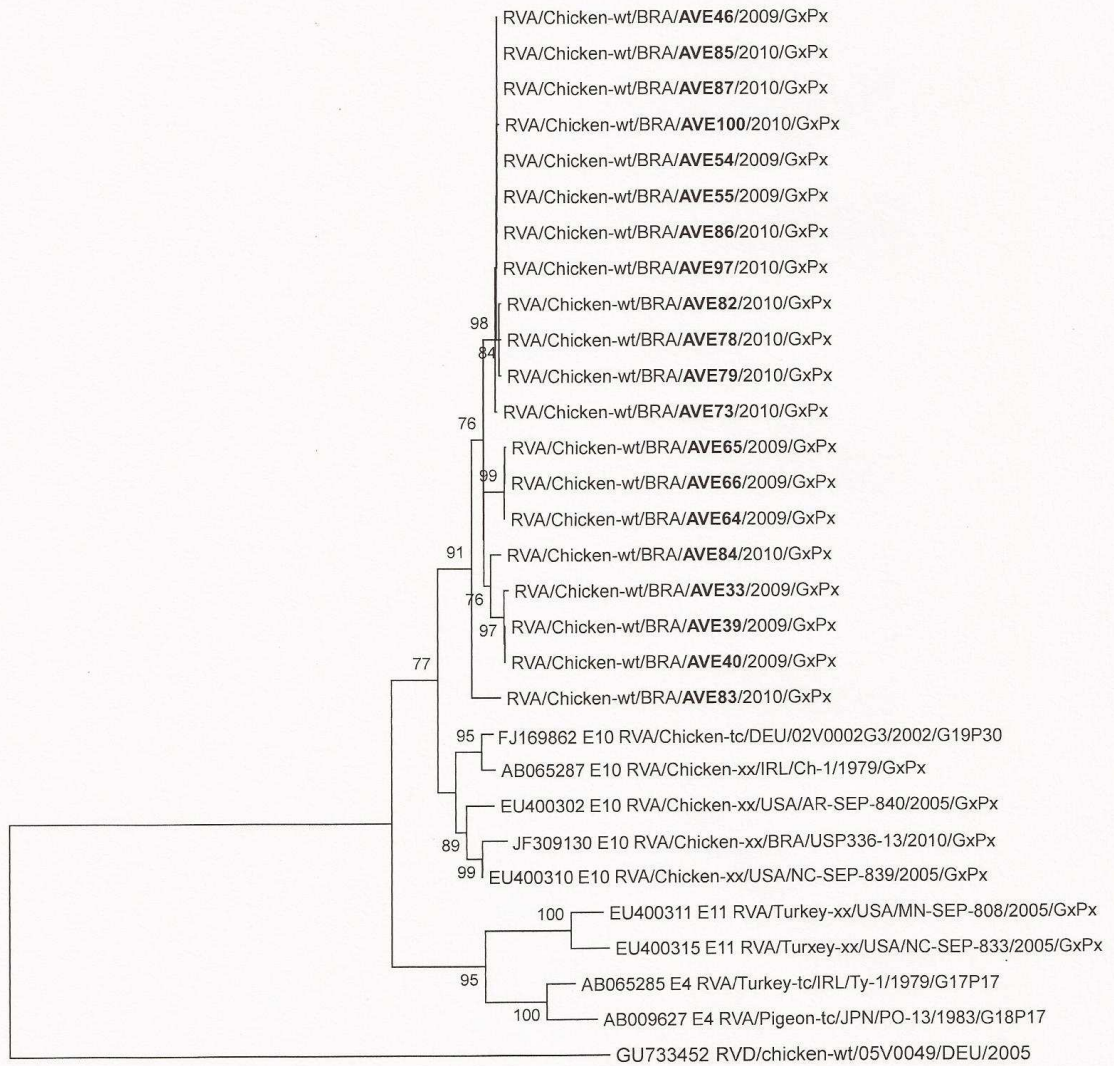
516

517

518

519





0.1

E-mail: [cavanagh@metronet.co.uk](mailto:cavanagh@metronet.co.uk) URL: <http://mc.manuscriptcentral.com/cavp>



