

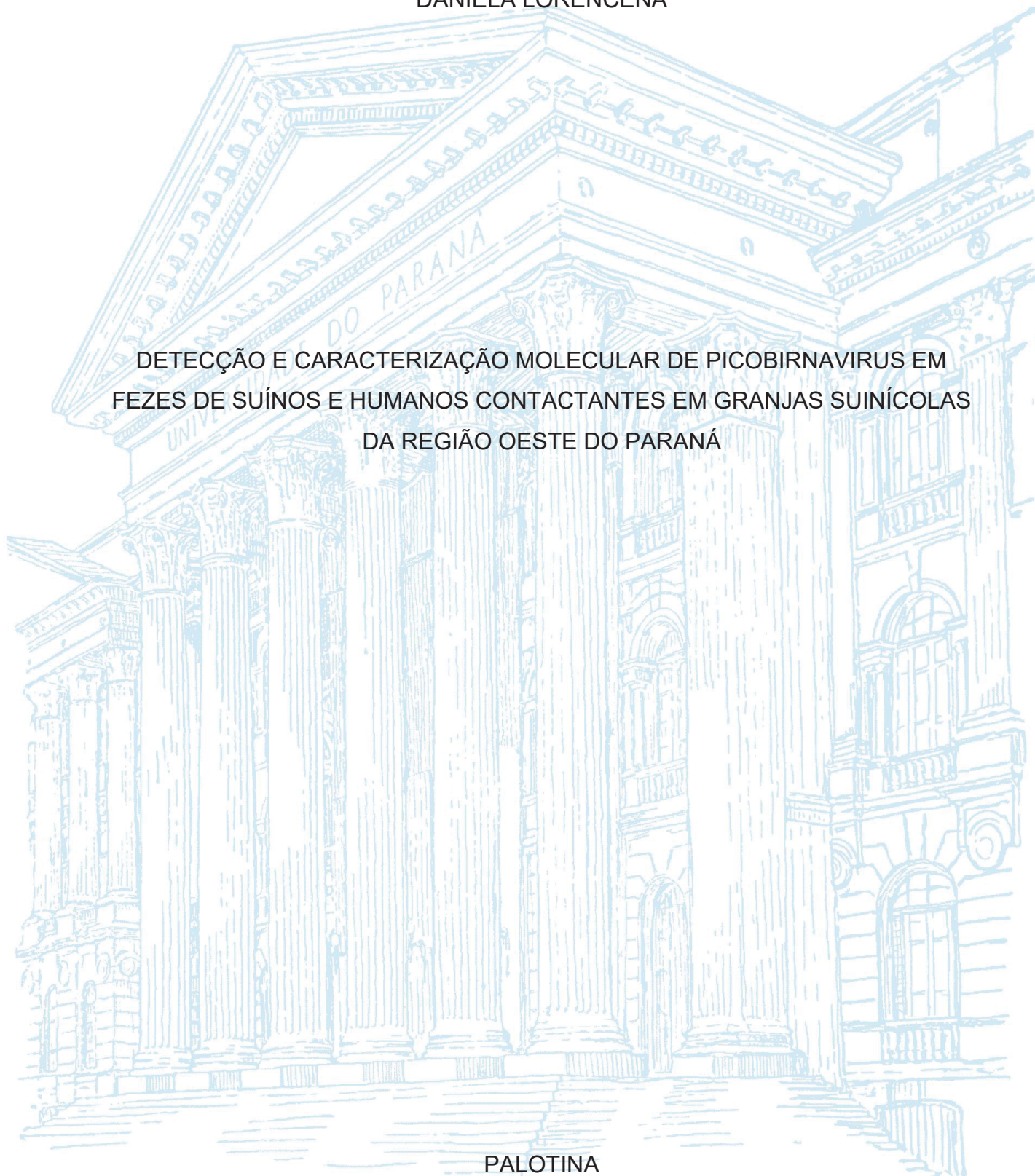
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELA LORENCENA

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM
FEZES DE SUÍNOS E HUMANOS CONTACTANTES EM GRANJAS SUINÍCOLAS
DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

PALOTINA

2019



DANIELA LORENCENA

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM
FEZES DE SUÍNOS E HUMANOS CONTACTANTES EM GRANJAS SUINÍCOLAS
DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração em Saúde Animal, linha de pesquisa em Microbiologia Aplicada à Produção Animal, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabete Takiuchi

PALOTINA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

L868 Lorencena, Daniela
Detecção e caracterização molecular de picobirnavirus em fezes de suínos e humanos contactantes em granjas suícolas da região oeste do Paraná / Daniela Lorencena – Palotina, 2019. 92f.

Orientadora: Elisabete Takiuchi
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

1. Picobirnavirus. 2. Humano. 3. Suíno. 4. Genogrupo I. 5. Genogrupo II. I. Takiuchi, Elisabete. II. Universidade Federal do Paraná. VI. Título.

CDU 636.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR PALOTINA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA ANIMAL -
40001016077P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de DANIELA LORENCENA intitulada: **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM FEZES DE SUÍNOS E HUMANOS CONTACTANTES EM GRANJAS SUINÍCOLAS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ**, sob orientação da Profa. Dra. ELISABETE TAKIUCHI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 07 de Outubro de 2019.

ELISABETE TAKIUCHI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

FLAVIA POSSATTI

Avaliador Externo (FACULDADE DO CENTRO DO PARANÁ)

MARCO ANTÔNIO BACELLAR BARREIROS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Daniela Lorencena, filha de Ronei Lorencena e Ledair Rita Batistussi Lorencena, natural de Paranaguá-PR, 31 de maio de 1994. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, em 2017. No mesmo ano ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade Federal do Paraná, setor Palotina, atuando principalmente na área de Virologia Animal e Biologia Molecular.

Dedico
Ao meu irmão Dhiego Arcângelo (in memorian),
que um dia também teve este sonho.
Para sempre a luz da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por tudo o que tem me proporcionado. Sou grata por me permitir realizar meus sonhos, conforme a sua vontade.

Agradeço imensamente à UFPR, que foi minha casa durante quase 8 anos e me proporcionou experiências que levarei comigo por toda a vida.

A todos os professores, técnicos e demais colaboradores da UFPR, que tornaram possível a minha formação e a realização desta pesquisa. Especialmente, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e a CAPES, pela oportunidade.

Aos laboratórios parceiros da UFPR Palotina: o Lacoma, o Biotec e o Labiogen, agradeço por compartilharem o espaço e os equipamentos. A execução deste trabalho não seria possível sem a colaboração de vocês.

Às equipes do Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao Prof. Dr. Amauri Alfieri, à Dra. Elis Lorenzetti e à grande amiga Msc. Jéssica C. Gallego, e do Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Viçosa, sobretudo ao Prof. Dr. Abelardo Silva Júnior e à Msc Nivia Rosado, por auxiliarem nas incessantes tentativas do sequenciamento genético das amostras de PBV.

À banca avaliadora, Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros e Profa. Dra. Flávia Possatti, por terem aceitado o convite.

À minha orientadora, Elisabete Takiuchi, que foi muito mais do que isso. Obrigada por ter acreditado e confiado em mim desde a graduação e me mostrado os caminhos da pesquisa. Agradeço por todos os conselhos e toda a paciência que teve comigo, sempre me acalmando e mostrando que as coisas eram possíveis e iriam melhorar. Mesmo eu cometendo tantos erros, sempre os corrigiu evidenciando as minhas qualidades, obrigada por tanto!

A todos aqueles que colaboraram para a execução deste trabalho, em especial ao médico veterinário Fábio Resmini, que possibilitou e auxiliou as coletas nas granjas de suínos e a todos as pessoas que aceitaram participar desta pesquisa.

À toda a equipe do Laboratório de Virologia Animal da UFPR e seus agregados, por tornarem os dias mais divertidos e por toda a parceria durante os dias de trabalho.

A todos os amigos que fiz em Palotina neste período, por terem tornado esta jornada mais fácil e prazerosa, principalmente à Flávia e sua mãe e irmã, pessoas muito especiais que se tornaram minha segunda família.

Aos meus amigos “da praia”, que sonharam este sonho junto comigo. Por todas as vezes que tudo parecia impossível, me darem força e sempre estarem lá por mim. Pela paciência em ouvir infinitamente sobre o meu trabalho e me acalmarem nas dificuldades. Sinto-me privilegiada por ter uma amizade como a nossa, obrigada por acreditarem em mim mesmo quando nem eu acreditei.

Agradeço profundamente à minha amiga Andressa, que me ajudou desde o início do mestrado, dividiu seus conhecimentos e experiências de forma muito generosa, sendo fundamental na realização deste trabalho. Sou muito grata pelos momentos que pude compartilhar com você e com a Jana durante todo esse tempo, e espero que sigamos juntas sempre.

Aos meus pais, meus maiores incentivadores. Por serem minha referência e a principal motivação de tudo o que eu faço; se tento ser melhor, é por vocês. Não tenho palavras para expressar minha gratidão por sempre acreditarem e confiarem em mim. Sou muito feliz por sempre ter para onde voltar.

*“Depois de escalar uma grande montanha, apenas se descobre que existem muitas
outras montanhas para escalar”*

Nelson Mandela

RESUMO

Os *Picobirnavirus* (PBV) constituem um grupo de vírus emergentes pertencente à família *Picobirnaviridae*. São vírus de genoma de RNA fita dupla bissegmentado (dsRNA), envolto por capsídeo icosaédrico e não-envelopado. O PBV pode infectar diversas espécies hospedeiras, incluindo humanos e outros mamíferos marinhos e terrestres, aves e répteis. Diversos estudos moleculares têm sugerido a transmissão interespecie do PBV, devido à alta identidade observada entre estirpes virais de diferentes espécies hospedeiras, destacando o possível potencial zoonótico do PBV entre suínos e humanos. Contudo, a maioria dos estudos comparou sequências de PBV obtidas de suínos e humanos sem nenhuma relação epidemiológica entre eles. Este estudo propõe a investigação de ocorrência e caracterização molecular de PBV a partir de amostras fecais de suínos de cinco granjas comerciais, bem como dos humanos contactantes com os animais das respectivas granjas. Foram analisadas 197 amostras de fezes de suínos, de diferentes idades e categorias, e 12 amostras de fezes de humanos. O PBV foi detectado em 28,4% (56/197) e 41,6% (5/12) pela EGPA e 42,6% (84/197) e 16,7% (2/12) pela RT-PCR em suínos e humanos, respectivamente. A frequência de detecção do PBV por EGPA foi significativa em matrizes em lactação em comparação aos leitões e fêmeas gestantes. Os produtos amplificados baseados na sequência parcial do gene RdRp foram em sua maioria caracterizados como genogrupo I do PBV (PBV-GI), sendo uma amostra de humano e uma amostra de suíno positivas para o genogrupo II (PBV-GII). Devido à baixa qualidade das sequências, não foi possível realizar a caracterização molecular entre isolados de PBV humano e suínos relacionados (contactantes entre si). Porém, a análise filogenética da sequência parcial de PBV-GII humano obtido neste estudo, demonstrou 100% de identidade aminoacídica com PBV de espécies heterólogas (suínos e macaco rhesus) e de localidades distintas. Este é o primeiro estudo a propor uma análise comparativa entre espécies contactantes entre si no mesmo espaço de tempo/local. A alta frequência de detecção encontrada reforça a necessidade de continuidade dos estudos que avaliem a patogênese do PBV e elucidar o papel desses vírus em populações expostas à infecção.

Palavras-chave: Picobirnavírus, humano, suíno, genogrupo I, genogrupo II.

ABSTRACT

Picobirnavirus (PBV) is a group of emerging viruses belonging to the *Picobirnaviridae* family. They are bisegmented double-stranded RNA genome virus (dsRNA), encased in an icosahedral and non-enveloped capsid. PBV can infect a variety of host species, including humans and other marine and terrestrial mammals, birds and reptiles. Several molecular studies have suggested interspecies transmission of PBV, due to the high identity observed between viral strains of different host species, highlighting the possible zoonotic potential of PBV between pigs and humans. However, most studies have compared PBV sequences obtained in swine and human hosts, with no epidemiological relationship between them. This study proposed the investigation of the occurrence and molecular characterization of PBV from fecal samples of pigs from five commercial farms, and the pig farms workers contactants of the respective farms. A total of 197 swine stool samples of different ages and categories and 12 stool samples from contacting humans were analyzed. PBV was detected in 28.4% (56/197) and 41.6% (5/12) by PAGE and 42.6% (84/197) and 16.7% (2/12) by RT-PCR in pigs and humans, respectively. The frequency of PBV detection by PAGE was significant in lactating sows compared to piglets and pregnant females. Amplified products based on the partial sequence of the RdRp gene were mostly characterized as PBV genogroup I (PBV-GI), being one human and one swine sample positive to genogroup II (PBV-GII). Due to the low quality of the sequences, it was not possible to perform molecular characterization between human and porcine (contacting each other) PBV isolates. However, the phylogenetic analysis of the partial sequence of human PBV-GII obtained in this study demonstrated 100% amino acid identity with PBV from heterologous species (swine and rhesus macaque) from different localities. This is the first study to propose a comparative analysis between contacting species in the same time / place. The high frequency of detection found reinforces the need for further studies to evaluate the pathogenesis of PBV and to elucidate the role of these viruses in populations exposed to infection.

Keywords: Picobirnavirus, human, swine, genogroup I, genogroup II.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1** - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VIRION DE PBV 19
- FIGURA 2** - PERFIS ELETROFORÉTICOS DE PBV DETECTADOS EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CORADO COM NITRATO DE PRATA. CANALETAS 1 E 4: PADRÃO DE MIGRAÇÃO DO ROTAVIRUS BOVINO ESPÉCIE A. CANALETAS 2, 5 E 6: AMOSTRAS NEGATIVAS. CANALETA 3: PBV LARGE PROFILE. CANALETA 7: PBV SMALL PROFILE. 20
- FIGURA 3** - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DE PBV, BASEADO NA SEQUÊNCIA COMPLETA DE PBV EM HOSPEDEIRO HUMANO..... 21
- FIGURA 4** - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DETECÇÃO DE PBV EM DIFERENTES ESPÉCIES HOSPEDEIRAS E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS. 22
- FIGURA 5** - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DO PBV. OS PAÍSES QUE TEM RELATOS DE PBV ESTÃO INDICADOS NA COR VERMELHA. 23

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1** – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA) SEGUIDA PELA COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA. CANALETA 01: AMOSTRA POSITIVA DE PBV HUMANO *LARGE PROFILE*; CANALETAS 02 A 05: AMOSTRAS PBV POSITIVAS PARA PBV SUÍNO *LARGE PROFILE*; CANALETAS 06 E 07: AMOSTRAS PBV NEGATIVAS; CANALETA 08: PERFIL ELETROFORÉTICO DE ROTAVÍRUS A BOVINO (CONTROLE POSITIVO DE EXTRAÇÃO E EGPA) E CANALETA 09: CONTROLE NEGATIVO. 47
- FIGURA 2** – A) RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 201PB DO GENE RDRP DO PBV-GI. CANALETA 01: PADRÃO DE TAMANHO MOLECULAR DE 1KB; CANALETAS 02, 04, 05, 07, 09, 10, 11, 12 E 13: AMOSTRAS PBV-GI DE SUÍNO POSITIVAS; CANALETAS 03, 06 E 08: AMOSTRAS PBV-GI NEGATIVAS; CANALETA 13: CONTROLE NEGATIVO. B) RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 369PB DO GENE RDRP DO PBV-GII. CANALETA 01: CONTROLE NEGATIVO; CANALETAS 02 E 03: AMOSTRA PBV-GII DE HUMANO POSITIVA; CANALETA 04: PADRÃO DE TAMANHO MOLECULAR DE 1KB. 47
- FIGURA 3** - RELAÇÃO FILOGENÉTICA ENTRE VARIANTES GENÔMICAS DE PBV-GI, PBV-GII E PBV-GIII, BASEADAS EM 356 NUCLEOTÍDEOS DO GENE RDRP (SEGMENTO 2). A SEQUÊNCIA OBTIDA NESTE ESTUDO ESTÁ INDICADA PELO SÍMBOLO ●. A ÁRVORE FILOGENÉTICA FOI CONSTRUÍDA UTILIZANDO O MÉTODO *MAXIMUM LIKELIHOOD*, E O MODELO EVOLUTIVO *TAMURA 3* PARÂMETROS COM 1000 REPETIÇÕES DE *BOOTSTRAP*. OS VALORES DE *BOOTSTRAP* SÃO INDICADOS PRÓXIMOS AOS NÓS. AS BARRAS REPRESENTAM UNIDADES DE SUBSTITUIÇÃO POR NUCLEOTÍDEO. 50

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1 - ESTUDOS DE DETECÇÃO DE PBV EM HUMANOS, DE ACORDO COM A LOCALIDADE, MÉTODO DIAGNÓSTICO E GENOGRUPO.....	28
TABELA 2 - ESTUDOS DE DETECÇÃO DE PBV EM SUÍNOS, DE ACORDO COM A LOCALIDADE, MÉTODO DIAGNÓSTICO E GENOGRUPO.....	29

CAPÍTULO 1

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS DE ACORDO COM A PROPRIEDADE, CATEGORIA E CONDIÇÃO FISIOLÓGICA DOS ANIMAIS	44
TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA PBV SUÍNO DE ACORDO COM A GRANJA E A TÉCNICA DIAGNÓSTICA UTILIZADA.	48
TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO DE POSITIVIDADE PARA O PBV POR CATEGORIA ANIMAL, DE ACORDO COM A TÉCNICA UTILIZADA.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
cDNA - DNA complementar
CEUA - Comissão de ética no uso de animais
dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
dsRNA - RNA de dupla fita (*Double stranded RNA*)
DEPC - Dietilpirocarbonato
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGPA - Eletroforese em gel de poliacrilamida
GI - Genogrupo I
GII - Genogrupo II
GVHD - Doença do enxerto contra hospedeiro (*Graft-versus-host disease*)
HCl – Ácido clorídrico
HIV - Vírus da imunodeficiência humana (*Human immunodeficiency virus*)
ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee of Taxonomy of Virus*)
Kb - kilobase
L - Litro
mL – Mililitro
mM - Milimolar
NGS – Sequenciamento de nova geração (*Next generation Sequencing*)
nm - Nanômetro
ORF - Fase de leitura aberta (*Open reading frame*)
pb - Pares de bases
PBV - *Picobirnavirus*
PCR - Reação em cadeia pela polimerase (*Polymerase chain reaction*)
pH - Potencial hidrogeniônico
pmol - Picomol
RdRp - RNA polimerase dependente de RNA (*RNA-dependent RNA polymerase*)
RNA - Ácido ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
rpm - Rotação por minuto
RT - Transcrição reversa (*Reverse transcription*)
RVA – Rotavírus A

SDS - Sódio dodecil sulfato

TBE - Tris, ácido Bórico e ácido etilenodiamino tetra-acético.

µg - Micrograma

µL - Microlitro

UV - Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1	Introdução geral	18
2	Revisão de literatura	19
2.1	PBV em humanos e suínos	27
2.1.1	PBV e transmissão interespécie	30
	REFERÊNCIAS – REVISÃO DE LITERATURA	32
3	OBJETIVOS	40
3.1	OBJETIVOS GERAIS	40
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
4	CAPITULO 1 – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM FEZES DE SUÍNOS E HUMANOS CONTACTANTES EM GRANJAS SUINÍCOLAS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ	41
4.1	INTRODUÇÃO.....	42
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.3	RESULTADOS.....	46
4.4	DISCUSSÃO.....	51
4.5	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS – CAPÍTULO 1.....	57
5	CONCLUSÃO GERAL	62
	REFERÊNCIAS	63
7	APÊNDICES	73

1 INTRODUÇÃO GERAL

O *Picobirnavirus* (PBV) é considerado um vírus emergente, de genoma RNA cadeia dupla (dsRNA), não-envelopado e de capsídeo icosaédrico. Sua nomenclatura refere-se às características estruturais, sendo “*pico*” relacionado ao pequeno tamanho do virion (35-40nm de diâmetro) e “*birna*” pelo genoma RNA bissegmentado do genoma viral (PEREIRA et al., 1988). Constitui o único gênero pertencente à família *Picobirnaviridae*, possuindo duas espécies reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV): *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus* (DELMAS et al., 2019).

É um vírus considerado oportunista, sendo amplamente descrito em pacientes imunocomprometidos, como aqueles submetidos a tratamento imunossupressor prolongado e em humanos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CUNLIFFE et al., 1996; GIORDANO et al., 1998; GIORDANO et al., 1999). Em animais, esta relação também já foi observada, como nos suínos em períodos de maior estresse fisiológico e em animais silvestres mantidos em cativeiro (HAGA et al., 1999; FREGOLENTE et al., 2009; MARTINEZ et al., 2010; MASACHESSI et al., 2012).

Análises filogenéticas das estirpes de PBV demonstram que a infecção não está restrita a um hospedeiro e nem a uma localidade, infectando uma ampla variedade de espécies em todo o mundo (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014; WOO et al., 2016; DURAISAMY et al., 2018; MALIK et al., 2018). Alguns estudos de caracterização molecular têm sugerido a possibilidade de transmissão interespecie, com destaque para o potencial zoonótico do PBV entre suínos e seres humanos. No entanto, a maioria dos estudos comparou sequências de PBV obtidas de suínos e de humanos sem qualquer relação epidemiológica entre eles (BANYAI et al., 2008; GANESH et al., 2010; GIORDANO et al., 2011).

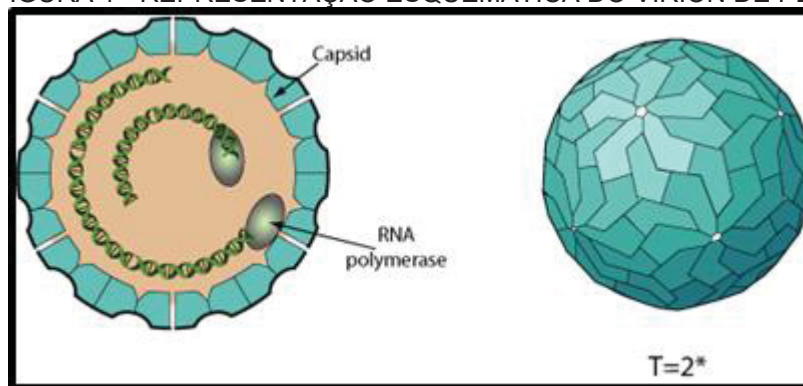
Diante do exposto, o objetivo deste estudo é investigar a ocorrência do PBV em hospedeiros suínos e humanos contactantes e realizar a caracterização molecular e análise filogenética destes achados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Picobirnavirus (PBV) constitui o único gênero pertencente à família *Picobirnaviridae*, e possui duas espécies reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV): *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus*. A nomenclatura está relacionada à sua estrutura: onde o prefixo “*pico*” faz referência ao pequeno tamanho (33-37nm de diâmetro), “*b*” por se tratar de um genoma bissegmentado e “*RNA*” caracterizando a natureza do genoma viral (DELMAS et al., 2019).

Os PBVs são vírus não-envelopados e de capsídeo icosaédrico, que protege os dois segmentos genômicos de RNA de cadeia dupla (dsRNA) – segmentos 1 e 2 (FIGURA 1). O segmento 1 (segmento maior), possui tamanho entre 2,2 a 2,7kb, e o segmento 2 (segmento menor), com tamanho variando de 1,2 a 1,9kb (MALIK et al., 2014). O tamanho dos segmentos é estimado com base no perfil de migração eletroforética em gel de poliacrilamida do genoma segmentado de uma estirpe padrão de rotavírus bovino (11 segmentos) (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VIRION DE PBV



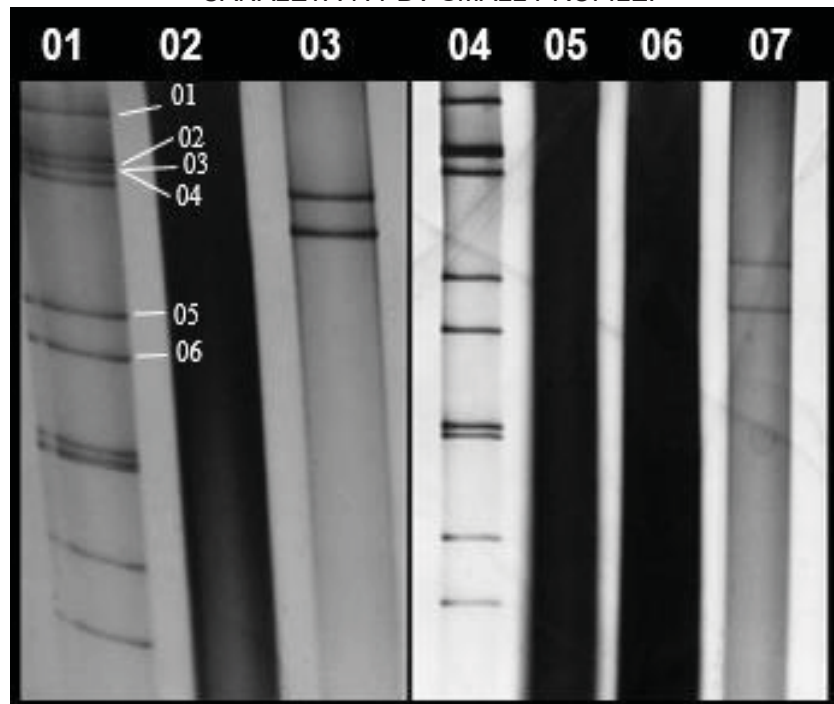
FONTE: Viral Zone (2017)¹.

Considerando a variação dos tamanhos dos dois segmentos genômicos e o perfil de migração em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), o PBV pode ser classificado em dois padrões eletroforéticos: Perfil *small* e Perfil *large* (FIGURA 2). No perfil *large*, os tamanhos estimados do maior e menor segmento correspondem a 2,7kb e 1,9 kb, respectivamente. Considerando o perfil *small*, o segmento 1 tem 2,2 kb e o segmento 2 tem 1,2 kb, aproximadamente (MALIK et al., 2014).

A proteína de capsídeo e a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do PBV são codificadas pelo segmento genômico 1 e 2, respectivamente. Com base na

variabilidade genética da RdRp, os PBVs são classificados em dois genogrupos: Genogrupo I (GI) e II (GII) (ROSEN et al., 2000; BANYAI et al., 2003). A partir de um estudo de viroma, uma estirpe de PBV humano encontrado demonstrou baixa identidade de aminoácidos do gene que codifica a RdRp, quando comparado aos já conhecidos GI e GII, sendo sugerida a incorporação do PBV genogrupo III (GIII) (SMITS et al., 2014).

FIGURA 2 - PERFIS ELETROFORÉTICOS DE PBV DETECTADOS EM AMOSTRAS FECAIS DE BEZERROS POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CORADO COM NITRATO DE PRATA. CANALETAS 1 E 4: PADRÃO DE MIGRAÇÃO DO ROTAVIRUS BOVINO ESPÉCIE A. CANALETAS 2, 5 E 6: AMOSTRAS NEGATIVAS. CANALETA 3: PBV LARGE PROFILE. CANALETA 7: PBV SMALL PROFILE.

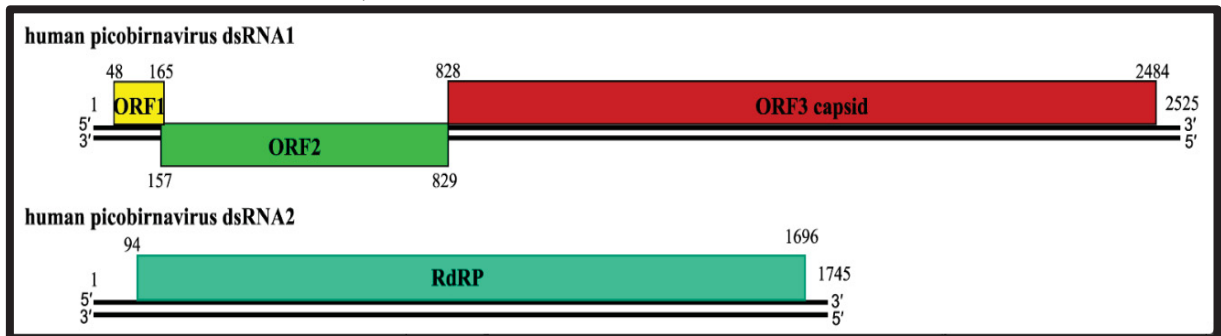


FONTE: Takiuchi et al. (2016).

A organização do genoma do PBV (FIGURA 3), baseia-se no primeiro sequenciamento completo dos dois segmentos (números de acesso GenBank NC_007026.1 e NC_007027.1) que foi realizado a partir de uma amostra proveniente de uma criança com gastroenterite aguda na Tailândia (WAKUDA, PONGSUWANNA e TANIGUCHI, 2005). O segmento 1 codifica três janelas de leitura aberta (ORFs): A ORF1, de 39 aminoácidos, de função não elucidada; a ORF2, que codifica uma proteína hidrofílica de função desconhecida, com 224 aminoácidos e a ORF3, que codifica uma proteína de capsídeo, com 552 aminoácidos. O segmento 2, possui uma

ORF de 534 aminoácidos e codifica a RdRp (WAKUDA, PONGSUWANNA e TANIGUCHI, 2005; GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014; DELMAS et al., 2019).

FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DE PBV, BASEADO NA SEQUÊNCIA COMPLETA DE PBV EM HOSPEDEIRO HUMANO.



FONTE: Delmas et al. (2019).

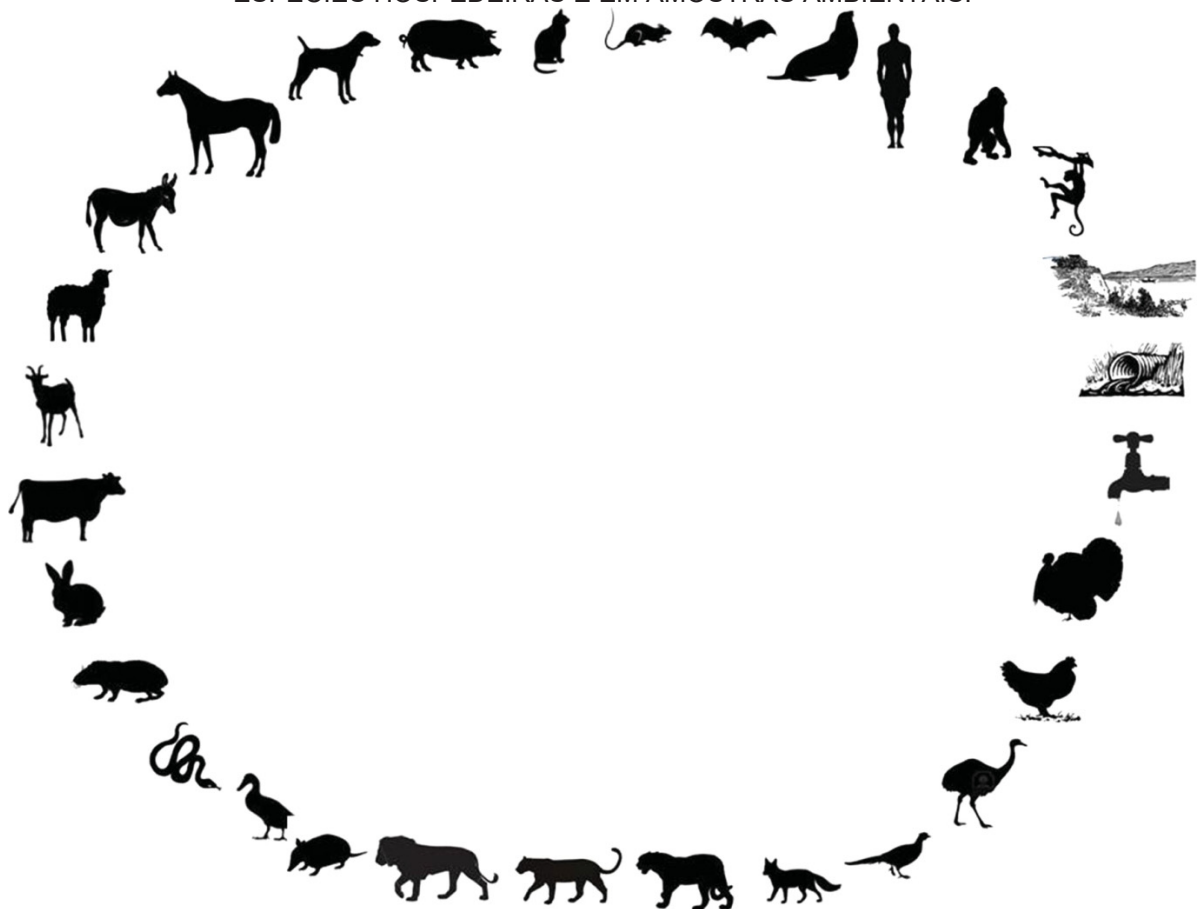
Análises de sequências completas e parciais dos segmentos genômicos 1 e 2, revelaram alta diversidade genética entre as estirpes de PBV nas diferentes espécies hospedeiras e até mesmo entre elas (GALLAGHER et al., 2017). A identidade entre os PBV GI e GII é de aproximadamente 40% para nucleotídeos e 20% para aminoácidos, sendo ainda desconhecida a relevância clínica e biológica entre os genogrupos. A variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos é alta, mesmo dentro de um mesmo genogrupo, o que evidencia a alta variabilidade do vírus (ROSEN et al., 2000; BÁNYAI et al., 2003; MARTINEZ et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2006; GANESH et al., 2010).

A nomenclatura para a caracterização dos isolados de PBV foi proposta por Fregolente e Gatti (2009), com a especificação do hospedeiro, país de origem (abreviado em três letras), identificação da amostra e ano de identificação; todas as informações separadas por barras. Quando for possível a determinação do genogrupo, este deve ser especificado primeiramente. O exemplo GI/PBV/human/CHN/1-CHN97/1997 faz referência à amostra 1-CHN97, isolada de um ser humano na China em 1997 e caracterizada como PBV-GI.

O PBV foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1988, sendo detectado ocasionalmente em fezes humanas, em uma investigação de rotavírus em crianças pela técnica EGPA, na qual observou-se o genoma bissegmentado do vírus (PEREIRA et al., 1988). Desde então, o PBV tem sido detectado em fezes e excreções respiratórias de humanos e de outras espécies animais, além de águas residuais em

diferentes localizações geográficas no mundo. A representação esquemática da detecção de PBV em diversas espécies animais e amostras ambientais, até o ano de 2014, é mostrado na FIGURA 4. Além dos ilustrados, foi reportada ainda a presença do PBV em outros hospedeiros, entre eles o orangotango, ema, lobo, cervídeos, dromedários, marmota-himalaia e demônio da Tasmânia (MASACHESSI et al., 2012; CONCEICAO-NETO et al., 2016; GALLAGHER et al., 2017; LUO et al., 2018; CHONG et al., 2019; KUHAR e JAMNIKAR-CIGLENEKI, 2019).

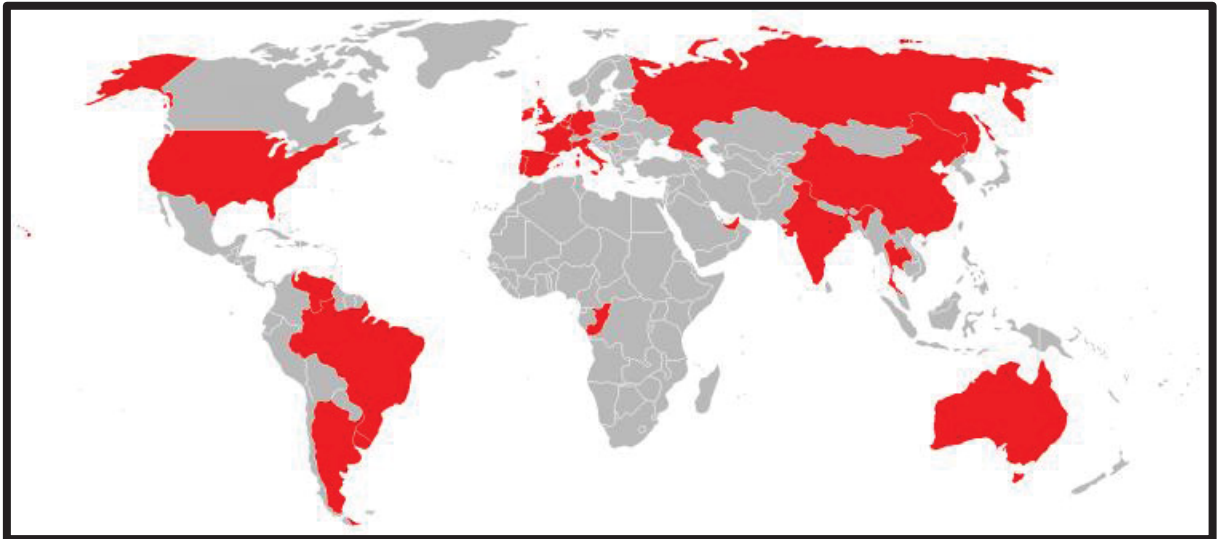
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DETECÇÃO DE PBV EM DIFERENTES ESPÉCIES HOSPEDEIRAS E EM AMOSTRAS AMBIENTAIS.



FONTE: Adaptado de Ganesh, Masachessi e Mladenova, (2014).

A distribuição do PBV é mundial, tendo sido relatado em diversos países: Alemanha, Argentina, Austrália, Bélgica, Brasil, China, Espanha, Estados Unidos da América, Grã-Bretanha, Holanda, Hungria, Índia, Irlanda, Itália, Rússia, Sul da Ásia, Tailândia, Uruguai e Venezuela (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014), além de França (DACHEUX et al., 2014), Emirados Árabes Unidos (WOO et al., 2014) e São Cristóvão e Nevis (NAVARRO et al., 2017). O mapa que representa a distribuição mundial do PBV está ilustrado na FIGURA 5.

FIGURA 5 - DISTRIBUIÇÃO MUNDIAL DO PBV. OS PAÍSES QUE TEM RELATOS DE PBV ESTÃO INDICADOS NA COR VERMELHA.



FONTE: Adaptado de Malik et al. (2014).

Dados publicados sobre a frequência do PBV são bastante diversificados entre as espécies, variando de 13% em humanos (GALLIMORE et al., 1995) e 8,3% em bovinos (TAKIUCHI et al., 2016) por EGPA, e 49,4% em frangos (RIBEIRO SILVA et al., 2014), 62% em ovinos (KUNZ et al., 2018), 65% em suínos (BANYAI et al., 2008), 45% em emas, além de 33% em efluentes de águas residuais, por RT-PCR. As frequências de ocorrência do PBV são variáveis, estando relacionadas principalmente à espécie analisada, a técnica utilizada, o local e período de estudo, o tamanho da amostragem e as condições do hospedeiro, como o estado fisiológico e a imunidade (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

Quanto aos dois genogrupos, observa-se uma maior frequência de ocorrência de PBV GI em relação ao GII (MALIK et al., 2014). Isto pode ser atribuído à maior variabilidade genética deste último genogrupo, sendo esta heterogeneidade responsável pela menor complementariedade dos *primers* utilizados, comprometendo o anelamento e dificultando a detecção deste genogrupo. Contudo, não se pode excluir a possibilidade de haver uma menor circulação do PBV GII com relação ao GI (GANESH et al., 2012; NAVARRO et al., 2018).

Na China, Chen et al. (2014), compararam os achados para ambos genogrupos, demonstrando frequências que variaram de 84,6% de detecção do GI e 38,5% de GII em suínos, enquanto Leeuwen et al. (2010) encontraram 20% de PBV GI e 1% de PBV GII em humanos, evidenciando esta superioridade. Em análises metagenômicas observa-se esta mesma tendência de distribuição de ocorrência em

diferentes espécies, como furões, raposas e leões marinhos (LI et al., 2011; BODEWES et al., 2013; SMITS et al., 2013). Em contrapartida, Woo et al. (2014), encontraram alto número de *contigs* para ambos os genogrupos em dromedários. Estes resultados demonstram a necessidade da continuidade nos estudos de PBV para ambos os genogrupos em diferentes espécies para elucidar os aspectos ainda desconhecidos.

A maioria das sequências de PBV GII depositadas mundialmente no GenBank correspondem aos vírus detectados em suínos e humanos, havendo ainda muitas sequências depositadas não relacionadas a estudos publicados.

No Brasil os estudos de PBV GI prevalecem, havendo poucos resultados sobre a ocorrência de PBV GII em qualquer espécie. Entre estes estudos, Fregolente et al. (2009) testaram amostras de ratos, cães e cobras, e Navarro et al. (2018), investigaram a presença do PBV em bovinos, sendo detectado apenas o PBV GI em ambos os estudos. Recentemente, Lima et al. (2019), realizaram um estudo de viroma a partir fezes de frangos de corte, sendo encontrado PBV GI e II, caracterizando o primeiro achado de PBV GII no país.

A patogenia do PBV ainda não foi elucidada (LEEUWEN et al., 2010). Alguns estudos relacionam a infecção pelo PBV a sinais clínicos de gastroenterite, sendo detectado em fezes diarreicas humanas e de diferentes espécies animais (CASCIO et al., 1996; BHATTACHARYA et al., 2006; MONDAL et al., 2014; SMITS et al., 2014). Em contrapartida, considerando os animais de exploração econômica, a presença do PBV também já foi relatada em fezes não-diarreicas de bovinos (TAKIUCHI et al., 2016), ovinos (KUNZ et al., 2018), caprinos (MALIK et al., 2018), aves (RIBEIRO SILVA et al., 2014) e suínos (WILBURN et al., 2017).

Desde sua descoberta em 1988, o PBV era considerado um vírus essencialmente entérico, por sua detecção nas fezes (PEREIRA et al., 1988). Porém, em 2011, foi relatada a presença do vírus em *swabs* nasais de suínos na China (SMITS et al., 2011), e posteriormente, em lavados traqueais de humanos. Entretanto, devido à ausência de sinais clínicos respiratórios, a participação deste vírus como patógeno respiratório primário não foi elucidada (SMITS et al., 2012).

A possível natureza oportunista do PBV também tem sido investigada, sendo amplamente descrito em pacientes imunocomprometidos (GANESH et al., 2010). Em humanos, o PBV foi encontrado em pacientes submetidos a tratamento imunossupressor prolongado e em humanos infectados pelo vírus da imunodeficiência

humana (HIV) (CUNLIFFE et al., 1996; GIORDANO et al., 1998; GIORDANO et al., 1999).

Em animais silvestres, a excreção de PBV foi relatada nos indivíduos mantidos em cativeiro, sugerindo que o estresse do isolamento constitui um fator predisponente para a imunossupressão, infecção e replicação viral (HAGA et al., 1999; FREGOLANTE et al., 2009; MASACHESSI et al., 2012).

A relação imunossupressão e PBV também já foi observada em suínos, em que a maior excreção viral foi evidenciada nos períodos de maior estresse fisiológico, como final de gestação e no período de lactação das matrizes (MARTINEZ et al., 2010; CHEN et al., 2014).

O PBV tem sido identificado associado a outros patógenos já conhecidos como causadores de diarreia em humanos e animais, como o rotavírus (ALFIERI et al., 1994; BHATTACHARYA et al., 2006; GIORDANO et al., 2008), astrovírus, *Salmonella* (BHATTACHARYA et al., 2006), calicivirus (BANYAI et al., 2003) e *Escherichia coli* (BARRETO et al., 2006), reforçando a hipótese de que ele atue como um agente secundário e oportunista (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

O PBV foi encontrado em fezes de pacientes submetidos a transplante renal tratados com imunossupressores (VALLE et al., 2001). Recentemente, Legoff et al. (2017) realizaram o viroma de pacientes transplantados, havendo uma elevada taxa de detecção do PBV, correlacionando-o a casos de diarreia severa na ocorrência da doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD). Este resultado sugere que o PBV poderia desempenhar papel importante como biomarcador, na GVHD ou em outras doenças.

Estudos longitudinais sugerem que o PBV causa infecções prolongadas e intermitentes no hospedeiro, desde suas primeiras semanas de vida até a fase adulta, intercalando períodos de ausência e de alta e baixa excreção, podendo ser sintomática ou não (MARTINEZ et al., 2010; MASACHESSI et al., 2015). As análises das sequências nucleotídicas demonstraram que o vírus pode manter-se com ou sem mutações, indicando persistência do mesmo vírus no hospedeiro ou possíveis reinfecções com outras estirpes semelhantes. Estes dados demonstram que os animais podem permanecer assintomáticos durante toda a vida e atuar como reservatórios e disseminadores do vírus (MASACHESSI et al., 2012; WOO et al., 2016).

Recentemente, novos dados propuseram uma nova hipótese, que confronta

os conhecimentos sobre a patogenia do PBV até o momento. Em uma análise comparativa do genoma do PBV, identificou-se em algumas estirpes, o sítio de ligação ribossomal bacteriano (RBS), sugerindo que o PBV seja um vírus procariótico, que infecta além de animais, as bactérias do trato gastrointestinal (KRISHNAMURTY E WANG, 2018). Análise semelhante realizada por Adriaenssens et al. (2018) suportaram esta hipótese, ao encontrar a mesma característica em outras amostras de PBV, sugerindo uma nova família de bacteriófagos com um alto nível de diversidade genômica.

Para a detecção do vírus, a microscopia eletrônica foi muito utilizada no início das pesquisas envolvendo o PBV, com a visualização de partículas esféricas, de superfície icosaédrica, com aproximadamente 35nm de diâmetro (PEREIRA et al., 1988; HAGA et al., 1999; BUZINARO et al., 2003). Devido à ausência, até o momento, de um sistema de cultura de células adaptável, que o torna não cultivável *in vitro*, e a falta de um modelo animal adequado para a propagação viral, não foi possível ainda o desenvolvimento de métodos imunodiagnósticos (FREGOLENTE et al., 2009), sendo necessário o uso da microscopia eletrônica e técnicas moleculares como EGPA, RT-PCR e metagenômica para a detecção do PBV (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

O diagnóstico molecular do PBV baseia-se na detecção do genoma segmentado pela técnica EGPA, considerada a técnica ouro no seu diagnóstico. Esta técnica permite a separação dos dois segmentos genômicos de RNA de acordo com o tamanho molecular, diferenciando os PBVs em perfil *small* e perfil *large*. Entretanto, esta técnica requer altos títulos de excreção viral para a visualização do genoma no gel de poliacrilamida, conferindo-lhe baixa sensibilidade (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

Inicialmente, as detecções de PBV eram realizadas predominantemente através da EGPA. Entretanto, devido à baixa sensibilidade da técnica, adotou-se a utilização da RT-PCR, que aumentou em aproximadamente 100 vezes a taxa de detecção do PBV (ROSEN et al., 2000). Esta técnica, além de aumentar a sensibilidade e especificidade, permite a diferenciação dos genogrupos e a caracterização genômica e análise filogenética das estirpes de PBV (FREGOLENTE et al., 2009).

Apesar das limitações, a EGPA permite a detecção de qualquer genogrupo do PBV, desde que este esteja presente em altas concentrações, independente da

sequência genômica, o que diverge da RT-PCR, que necessita a utilização de *primers* específicos para cada genótipo. Ambas as técnicas devem ser utilizadas de forma complementar, de forma a aumentar a detecção e esclarecer os aspectos da infecção (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

Uma alternativa ainda pouco utilizada é a RT-PCR quantitativa (qRT-PCR), que possui elevada sensibilidade e especificidade. Esta técnica permite mensurar a carga viral no hospedeiro, auxiliando na compreensão clínica da infecção. Através da qRT-PCR, Woo et al. (2016) observaram uma superioridade na quantificação do segmento 1, comparado ao segmento 2. Ressalta-se que o segmento 2 é o alvo principal dos *primers* mais utilizados na RT-PCR convencional, podendo haver valores subestimados de infecção nos estudos epidemiológicos. Outro estudo quantificou o PBV em amostras de água de rio, e inferiu que esta técnica pode ser utilizada em amostras ambientais para mensurar a contaminação por dejetos humanos e animais (HAMZA et al., 2011).

O advento do sequenciamento de nova geração (NGS) levou a pesquisa a um novo patamar, possibilitando a execução da metagenômica viral, que permite a amplificação de sequências nucleotídicas de qualquer vírus presente em uma amostra, sem a necessidade de cultivo ou isolamento viral (KNOX et al., 2018). Tem sido utilizado para ampliar a detecção de agentes patogênicos em amostras de campo (CONCEICAO-NETO et al., 2016), caracterizando genomas de vírus que não são cultiváveis, como é o caso do PBV (ZHANG et al., 2006).

Para o PBV, estudos utilizaram a análise de viroma para identificar partículas virais em fezes, sendo detectado significativamente em diferentes espécies animais e em humanos (LI et al., 2015; CONCEICAO-NETO et al., 2016; LEGOFF et al., 2017), demonstrando sua presença na microbiota intestinal animal. Entretanto, apesar dos frequentes achados, pouco se conhece sobre a patogênese do PBV e sua possível interação com os demais micro-organismos.

2.1 PBV EM HUMANOS E SUÍNOS

A maioria dos estudos relacionados ao PBV referem-se aos achados em humanos, seguidos pelos realizados na espécie suína. Os primeiros relatos foram feitos pela técnica EGPA e desde então o PBV tem sido relatado em ambas as espécies em diferentes regiões geográficas do mundo, utilizando além da EGPA, as

técnicas de RT-PCR e mais recentemente, a metagenômica. A representação da detecção de PBV em humanos e suínos distribuídos pelo mundo todo, de acordo com a técnica utilizada e o(s) genogrupo(s) identificado(s) estão listados nas TABELAS 1 e 2, respectivamente.

TABELA 1 - ESTUDOS DE DETECÇÃO DE PBV EM HUMANOS, DE ACORDO COM A LOCALIDADE, MÉTODO DIAGNÓSTICO E GENOGRUPO.

Referência	País	Técnica utilizada	Genogrupo
Pereira et al., 1988	Brasil	EGPA	-
Grohmann et al., 1993	Estados Unidos	EGPA	-
Gallimore et al., 1995	UK	EGPA	-
Gonzalez et al., 1998	Venezuela	EGPA	-
Giordano et al., 1998; 1999	Argentina	EGPA	-
Rosen et al., 2000	China e EUA	EGPA / RT-PCR	GI e GII
Martinez et al., 2003	Argentina	EGPA /RT-PCR	GI
Banyai et al., 2003	Hungria	EGPA / RT-PCR	I
Wakuda et al., 2005	Tailândia	RT-PCR	Não definido
Barreto et al. 2006	Brasil	EGPA	-
Bhattacharya et al., 2006	Índia	EGPA /RT-PCR	GI e GII
Zhang et al., 2006	Estados Unidos	EGPA	-
Giordano et al., 2008	Argentina	EGPA	-
Duquerroy et al., 2009	França	Microscopia	-
Ganesh et al., 2010	Índia	EGPA /RT-PCR	GI
Giordano et al., 2010	Argentina	EGPA /RT-PCR	GI
Leeuwen et al., 2010	Países Baixos	RT-PCR	GI e GII
Sun et al., 2016	China	Metagenômica	GI, GII e GIII
Legoff et al., 2017	França	Metagenômica	Não definido

Fonte: A autora (2019)

TABELA 2 - ESTUDOS DE DETECÇÃO DE PBV EM SUÍNOS, DE ACORDO COM A LOCALIDADE, MÉTODO DIAGNÓSTICO E GENOGRUPO

Referência	País	Técnica utilizada	Genogrupo
Gatti et al., 1989	Brasil	EGPA	-
Chasey et al., 1990	UK	EGPA	-
Ludert et al., 1991	Venezuela	EGPA	-
Alfieri et al., 1994	Brasil	EGPA	-
Pongsuwanna et al. 1996	Tailândia	EGPA	-
Banyai et al., 2008	Hungria	EGPA / RT-PCR	GI
Carruyo et al., 2008	Venezuela	EGPA / RT-PCR	GI
Martinez et al., 2010	Argentina	EGPA/RT-PCR	GI
Giordano et al., 2011	Argentina	EGPA / RT-PCR	GI
Smits et al., 2011	China	RT-PCR	GI e GII
Ganesh et al., 2012	Índia	EGPA	-
Chen et al., 2014	China	RT-PCR	GI e GII
Zhang et al., 2014	China	Metagenômica	Não definido
Banyai et al., 2014	Itália	RT-PCR	GI
Wilburn et al., 2017	Tailândia	RT-PCR	GI e GII
Kylla et al., 2017	Índia	EGPA / RT-PCR	GI e GII

Fonte: A autora (2019)

O primeiro relato de PBV suíno foi realizado no Brasil por Gatti et al. (1989), que o encontraram em fezes diarreicas e não diarreicas, pela técnica EGPA. Posteriormente, outros estudos demonstraram a presença do PBV na espécie suína em todo o mundo. Ludert et al. (1991), através do EGPA, reportaram a presença do vírus distribuída igualmente em fezes diarreicas e não-diarreicas. Outros estudos confirmam a ampla distribuição da infecção pelo PBV em suínos sem qualquer associação com enterite (WILBURN et al., 2017).

Martinez et al. (2010) estudaram a circulação e os padrões de perpetuação de PBV em suínos de uma granja, demonstrando que o agente permaneceu detectável durante todo o período de estudo, sugerindo que o PBV é mantido na natureza por transmissão de animais assintomáticos aos indivíduos susceptíveis.

Chen et al. (2014), detectaram a presença de PBV GI e II em fezes de suínos de uma fazenda da China, havendo amostras positivas para ambos os genogrupos simultaneamente, demonstrando a coinfeção por diferentes genogrupos em um único hospedeiro.

Com relação à espécie humana, o PBV é amplamente estudado em todo o mundo, com frequências variadas em indivíduos com e sem gastroenterite

(GROHMANN et al., 1993; GALLIMORE et al., 1995; GIORDANIO et al., 1999; GANESH et al., 2010; LEGOFF et al., 2017).

Em pesquisas envolvendo indivíduos infectados com HIV, Grohman et al. (1993) demonstraram que a excreção do PBV ocorreu de forma intermitente, com intervalos que variavam de três a quatro meses. Um dos pacientes, com caso crônico de diarreia, excretou o PBV continuamente durante sete meses, sugerindo a característica oportunista do vírus frente a falha imunológica dos pacientes. Outros estudos subsequentes foram realizados, porém, ainda eram limitados à detecção do vírus pela EGPA (GALLIMORE et al., 1995; GIORDANO et al., 1998).

Em 2000, Rosen e colaboradores realizaram um estudo pioneiro de detecção por RT-PCR e caracterização molecular de PBVs isolados de fezes humanas, provenientes de pacientes HIV soronegativos e soropositivos. Os *primers* desenvolvidos neste estudo são amplamente utilizados para a detecção do PBV GI e GII.

2.1.1 PBV e transmissão interespecie

O aprimoramento das técnicas moleculares possibilitou análises mais precisas e consistentes das sequências genômicas obtidas do PBV. A alta identidade observada entre sequências nucleotídicas obtidas de diferentes espécies hospedeiras, sugerem fortemente um potencial zoonótico do vírus, uma hipótese interessante que merece ser estudada (BANYAI et al., 2008; GIORDANO et al., 2011; GANESH et al., 2012; GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

A análise filogenética do segmento 2 de PBV de humanos da Índia, demonstrou identidade de até 92% para nucleotídeos e 95% de identidade de aminoácidos com PBV detectados de suínos na Hungria (GANESH et al., 2010). De forma semelhante, na Argentina, Giordano et al. (2011) compararam sequências de PBV obtidas de humanos transplantados e de suínos, de regiões geográficas próximas, obtendo até 100% de identidade. Ambos resultados sugeriram que as estirpes suínas e humanas de PBV compartilham um ancestral em comum.

Carruyo et al. (2008) e Banyai et al. (2008) também encontraram alta identidade entre as sequências de PBV detectados em suínos com estirpes de PBV humano depositadas em bases públicas de dados.

Em 2011, Ganesh e colaboradores realizaram estudo com fezes de equinos,

no qual o PBV equino apresentou identidade de até 92% com estirpes humanas provenientes da mesma região geográfica, reforçando a hipótese de transmissão interespecie.

Esta estreita relação genética evidenciada entre PBV humano e animal sugerem o potencial zoonótico deste vírus, sendo necessária a vigilância ativa para descobrir sua origem, diversidade e implicações na saúde pública (MALIK, 2018). Apesar de diversos estudos já terem demonstrado estas evidências, até o momento não foi realizada nenhuma investigação simultânea de detecção e caracterização molecular de PBV detectados em animais e humanos contactantes.

REFERÊNCIAS – REVISÃO DE LITERATURA

- ADRIAENSSENS, E.; FARKAS, K.; HARRISON, C.; JONES, D.; ALLISON, H. E.; MCCARTHY, A. J. Viromic analysis of wastewater input to a river catchment reveals a diverse assemblage of RNA viruses. **American Society for Microbiology**, v. 3, n. 3, p. e00025-18, 2018.
- ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; FREITAS, J.; SILVA, C.; FREIRE, R.; BARROS, A.; BARREIROS, M.; MULLER, E. Occurrence of Escherichia coli, rotavirus, picobirnavirus and Cryptosporidium parvum in a post weaning diarrhoea focus in swine. **Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 5-7, 1994.
- ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; RESENDE, J.; RESENDE, M. A new bisegmented double stranded RNA virus in avian feces. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 40, p. 437-440, 1988.
- BANYAI, K.; JAKAB, F.; REUTER, G.; BENE, J.; UJ, M.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. **Archives of virology**, v. 148, n. 12, p. 2281-2291, 2003.
- BANYAI, K.; MARTELLA, V.; BOGDAN, A.; FORGACH, P.; JAKAB, F.; MELEG, E.; BIRO, H.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. **The Journal of general virology**, v. 89, n. Pt 2, p. 534-539, 2008.
- BARRETO, M. L.; MILROY, C. A.; STRINA, A.; PRADO, M. S.; LEITE, J. P.; RAMOS, E. A.; RIBEIRO, H.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; TEIXEIRA MDA, G.; RODRIGUES, L. C.; RUF, H.; GUERREIRO, H.; TRABULSI, L. R. Community-based monitoring of diarrhea in urban Brazilian children: incidence and associated pathogens. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 3, p. 234-242, 2006.
- BHATTACHARYA, R.; SAHOO, G. C.; NAYAK, M. K.; RAJENDRAN, K.; DUTTA, P.; MITRA, U.; BHATTACHARYA, M. K.; NAIK, T. N.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHNAN, T. Detection of Genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 229-238, 2006.
- BODEWES, R.; VAN DER GIESSEN, J.; HAAGMANS, B. L.; OSTERHAUS, A. D.; SMITS, S. L. Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. **Journal of virology**, v. 87, n. 13, p. 7758-7764, 2013.
- BUZINARO, M. G.; FREITAS, P. P.; KISIELLIUS, J. J.; UEDA, M.; JEREZ, J. A. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in calf faeces. **Veterinary journal**, v. 166, n. 2, p. 185-187, 2003.

- CARRUYO, G. M.; MATEU, G.; MARTINEZ, 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.
- CASCIO, A.; BOSCO, M.; VIZZI, E.; GIAMMANCO, A.; FERRARO, D.; ARISTA, S. Identification of Picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. **European Journal of Epidemiology**, v. 12, p. 545–547, 1996.
- CHASEY D. Porcine picobirnavirus in UK? **Veterinary Record**, v. 126, n. 18, p. 465, 1990.
- CHEN, M.; SUN, H.; LAN, D.; HUA, X.; CUI, L.; YUAN, C.; YANG, Z. Molecular detection of genogroup I and II picobirnaviruses in pigs in China. **Virus Genes**, v. 48, n. 3, p. 553-556, 2014.
- CHONG, R.; SHI, M.; GRUEBER, C. E.; HOLMES, E. C.; HOGG, C. J.; BELOV, K.; BARRS, V. R. Fecal viral diversity of captive and wild Tasmanian devils characterized using virion-enriched metagenomics and metatranscriptomics. **Journal of Virology**, v. 93, n. 11, p. 8-19, 2019.
- CONCEICAO-NETO, N.; MESQUITA, J. R.; ZELLER, M.; YINDA, C. K.; ALVARES, F.; ROQUE, S.; PETRUCCI-FONSECA, F.; GODINHO, R.; HEYLEN, E.; VAN RANST, M.; MATTHIJNSSENS, J. Reassortment among picobirnaviruses found in wolves. **Archives of virology**, v. 161, n. 10, p. 2859-2862, 2016.
- CUNLIFFE, N. A.; GLASS, R. I. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. **The Lancet**. p. 348-1037, 1996.
- DACHEUX, L.; CERVANTES-GONZALEZ, M.; GUIGON, G.; THIBERGE, J. M.; VANDENBOGAERT, M.; MAUFRAIS, C.; CARO, V.; BOURHY, H. A Preliminary Study of Viral Metagenomics of French Bat Species in Contact with Humans: Identification of New Mammalian Viruses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 87194, 2014.
- DELMAS, B., ATTOUI, H., GHOSH, S., MALIK, Y. S., MUNDT, E., VAKHARIA, V. N., AND ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Picobirnaviridae*, **Journal of General Virology**, v. 100, p. 133–134, 2019.
- 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. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 28, p. 1655-1665, 2009.
- DURASAMY, R.; AKIANA, J.; DAVOUST, B.; MEDIANNIKOV, O.; MICHELLE, C.; ROBERT, C.; PARRA, H. J.; RAOULT, D.; BIAGINI, P.; DESNUES, C. Detection of novel rna viruses from free-living gorillas, republic of the congo: Genetic diversity of picobirnaviruses. **Virus Genes**, v. 54, p. 256–271, 2018.

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

FREGOLENTE, M. C.; GATTI, M. S. Nomenclature proposal for picobirnavirus. **Archives of virology**, v. 154, n. 12, p. 1953-1954, 2009.

GALLAGHER, C. A., NAVARRO, R., CRUZ, K., AUNG, M. S., NG, A., BAJAK, E., BEIERSCHMITT, A., LAWRENCE, M., DORE, K. M., KETZIS, J., MALIK, Y. S., KOBAYASHI, N., GHOSH, S. Detection of picobirnaviruses in vervet monkeys (*Chlorocebus sabaues*): molecular characterization of complete genomic segment-2. **Virus Research**, v. 230, p. 13-18, 2017.

GALLIMORE, C. I.; GREEN, J.; CASEMORE, D. P.; BROWN, D. W. Detection of a picobirnavirus associated with Cryptosporidium positive stools from humans. **Archives of virology**, v. 140, n. 7, p. 1275-1278, 1995.

GANESH, B.; BANYAI, K.; MARTELLA, V.; JAKAB, F.; MASACHESSI, G.; KOBAYASHI, N. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. **Reviews in medical virology**, v. 22, n. 4, p. 245-256, 2012.

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, p. 52, 2011.

GANESH, B.; MASACHESSI, G.; MLADENOVA, Z. Animal picobirnavirus. **Virus disease**, v. 25, n. 2, p. 223-238, 2014.

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: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 511-516, 2010.

GATTI, M. S.; DE CASTRO, A. F.; FERRAZ, M. M.; FIALHO, A. M.; PEREIRA, H. G. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. **Research in veterinary science**, v. 47, n. 3, p. 397-398, 1989.

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

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; RINALDI, D.; ESPUL, C.; MARTINEZ, N.; ISA, M. B.; DEPETRIS, A. R.; MEDEOT, S. I.; NATES, S. V. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. **AIDS research and human retroviruses**, v. 15, n. 16, p. 1427-1432, 1999.

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; RINALDI, D.; GUINARD, S.; NARETTO, E.; CASERO, R.; YACCI, M. R.; DEPETRIS, A. R.; MEDEOT, S. I.; NATES, S. V. Detection of picobirnavirus in HIV-infected patients with diarrhea in Argentina.

Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association, v. 18, n. 4, p. 380-383, 1998.

GIORDANO, M. O.; MASACHESSI, G.; MARTINEZ, L. C.; BARRIL, P. A.; FERREYRA, L. J.; ISA, M. B.; NATES, S. V. Two instances of large genome profile picobirnavirus occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977-2002). **The Journal of infection**, v. 56, n. 5, p. 371-375, 2008.

GONZALEZ, G. G.; PUJOL, F. H.; LIPRANDI, F.; DEIBIS, L.; LUDERT, J. E. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. **Journal of Medical Virology**, v. 55, p. 288–292, 1998.

GROHMANN, G. S.; GLASS, R. I.; PEREIRA, H. G.; MONROE, S. S.; HIGHTOWER, A. W.; WEBER, R.; BRYAN, R. T. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 1, p. 14-20, 1993.

HAGA, I. R.; MARTINS, S. S.; HOSOMI, S. T.; VICENTINI, F.; TANAKA, H.; GATTI, M. S. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (Picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **Veterinary journal**, v. 158, n. 3, p. 234-236, 1999.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; UBERLA, K.; WILHELM, M. Evolution 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.

KNOX, M. A.; GEDYE, K. R.; HAYMAN, D. T. S. The challenges of analysing highly diverse Picobirnavirus sequence data. **Viruses**, v.10, p. 685-696, 2018.

KRISHNAMURTHY, S. R., WANGA, D. Extensive conservation of prokaryotic ribosomal binding sites in known and novel picobirnaviruses. **Virology**, v. 516, p. 108–114, 2018.

KUHAR, U.; JAMNIKAR-CIGLENEKI, U. High detection rate and high genetic diversity of genogroup I Picobirnaviruses from roe deer. *Infection, Genetic and Evolution*, v. 73, p. 210-213, 2019.

KUNZ, A. F.; POSSATTI, F.; FREITAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; TAKIUCHI, E. High detection rate and genetic diversity of picobirnavirus in a sheep flock in Brazil. **Virus research**, v. 255, p. 10-13, 2018.

KYLLA, H.; DUTTA, T. K.; ROYCHOUDHURY, P.; MALIK, Y. S.; MANDAKINI, R.; SUBUDHI, P. K. Prevalence and molecular characterization of porcine Picobirnavirus in piglets of North East Region of India. **Tropical animal health and production**, v. 49, n. 2, p. 417-422, 2017.

LEEUWEN, M. V.; 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. 10, p. 1787–94, 2010.

LEGOFF, J.; RESCHE-RIGON, M.; BOUQUET, J.; ROBIN, M.; NACCACHE, S.; MERCIER-DELARUE, S.; FEDERMAN, S.; SAMAYOA, E.; ROUSSEAU, C.; PIRON, P.; KAPEL, N.; SIMON, F.; SOCIÉ, G.; CHIU, C. Y. The eukaryotic gut virome in hematopoietic stem cell transplantation: new clues in enteric graft-versus-host disease. **Nature medicine**, v. 23, p. 1080-1085, 2017.

LI, L.; GIANNITTI, F.; LOW, J.; KEYES, C.; ULLMANN, L. S.; DENG, X.; ALEMAN, M.; PESAVENTO, P. A.; PUSTERLA, N.; DELWART, E. Exploring the virome of diseased horses. **The Journal of general virology**, v. 96, n. 9, p. 2721-2733, 2015.

LI, L.; SHAN, T.; WANG, C.; CÔTÉ, C.; KOLMAN, J.; ONIONS, D.; GULLAND, F.; DELWART, E. The Fecal Viral Flora of California Sea Lions. **Journal of Virology**, v. 85, n. 19, p. 9909-9917, 2011.

LIMA, D. A.; CIBULSKI, S. P.; TOCHETTO, C.; VARELA, A. P. M.; FINKLER, F.; TEIXEIRA, T. F.; LOIKO, M. R.; CERVA, C.; JUNQUEIRA, D. M.; MAYER, F. Q.; ROEHE, P. M. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. **Virus research**, v. 261, p. 9-20, 2019.

LUDERT, J. E.; HIDALGO, M.; GIL, F.; LIPRANDI, F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. **Archives of virology**, v. 117, n. 1-2, p. 97-107, 1991.

LUO, X.; LU, S.; JIN, D.; YANG, J.; WU, S.; XU, J. *Marmota himalayana* in the Qinghai-Tibetan plateau as a special host for bi-segmented and unsegmented picobirnaviruses. **Emerging microbes e infections**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2018.

MALIK, Y. S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; DHAMA, K.; SHABBIR, M. Z.; GANESH, B.; KOBAYASHI, N.; BANYAI, K. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric Picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-13, 2014.

MALIK, Y. S.; SIRCAR, S.; DHAMA, K.; SINGH, R.; GHOSH, S.; BANYAI, K.; VLASOVA, A. N.; NADIA, T.; SINGH, R. K. Molecular epidemiology and characterization of picobirnaviruses in small ruminant populations in India. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 63, p. 39–42, 2018.

MALIK, Y. S.; SIRCAR, S.; SAURABH, S.; KATTOOR, J. J.; SINGH, R.; GANESH, B.; GHOSH, S.; DHAMA, K.; SINGH, R. K. Epidemiologic status of Picobirnavirus in India, A less explored viral disease. **The Open Virology Journal**, v. 12, p. 99-109, 2018.

- MARTÍNEZ, L. C.; GIORDANO, M. O.; ISA, B. M.; ALVARADO, L. F.; PAVÁN, J. V.; RINALDI, D.; NATES, S. V. Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobirnavirus. **Intervirology**, v. 46, n. 4, p. 207-213, 2003.
- MARTINEZ, 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: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 7, p. 984-988, 2010.
- MASACHESSI, G.; GANESH, B.; MARTINEZ, L. C.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, M. B.; PAVAN, G. V.; MATEOS, C. A.; NATES, S. V. Maintenance of picobirnavirus (PBV) infection in an adult orangutan (*Pongo pygmaeus*) and genetic diversity of excreted viral strains during a three-year period. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 29, p. 196-202, 2015.
- MASACHESSI, G.; MARTINEZ, L. C.; GANESH, B.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, M. B.; IBARS, A.; PAVAN, J. V.; NATES, S. V. Establishment and maintenance of persistent infection by picobirnavirus in greater rhea (*Rhea Americana*). **Archives of virology**, v. 157, n. 11, p. 2075-2082, 2012.
- MONDAL, A.; MAJEE, S. Novel bisegmented virus (picobirnavirus) of animals, birds and humans. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, n. 4, p. 154-158, 2014.
- NATES, S. V.; GATTI, M. S. V.; LUDERT, J. E. The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential. **Future Virology**, v. 6, n. 2, p. 223-235, 2011.
- NAVARRO, J. O.; CANDIDO, M.; ALMEIDA-QUEIROZ, S. R.; BUZINARO, M. G.; LIVONESI, M. C.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. L. M. Genetic diversity of bovine *Picobirnavirus*, Brazil. **Virus genes**, v. 54, p. 724-728, 2018.
- NAVARRO, R.; YIBIN, C.; NAIR, R.; PEDA, A.; AUNG, M. S.; KETZIS, J.; MALIK, Y. S.; KOBAYASHI, N.; GHOSH, S. Molecular characterization of complete genomic segment-2 of picobirnavirus strains detected in a cat and a dog. **Infection, genetics and evolution**, v. 54, p. 200-204, 2017.
- PEREIRA, H. G.; FIALHO, A. M.; FLEWETT, T. H.; TEIXEIRA, J. M.; ANDRADE, Z. P. Novel viruses in human faeces. **Lancet**, v. 2, n. 8602, p. 103-104, 1988.
- PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASY, C.; URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1050-1057, 1996.
- RIBEIRO SILVA, R.; BEZERRA, D. A.; KAIANO, J. H.; OLIVEIRA DDE, S.; SILVESTRE, R. V.; GABBAY, Y. B.; GANESH, B.; MASCARENHAS, J. D. Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study. **The Journal of general virology**, v. 95, n. 1, p. 117-122, 2014.

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

SMITS, S. L.; POON, L. L.; VAN LEEUWEN, M.; LAU, P. N.; PERERA, H. K.; PEIRIS, J. S.; SIMON, J. H.; OSTERHAUS, A. D. Genogroup I and II picobirnaviruses in respiratory tracts of pigs. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. 2328-2330, 2011.

SMITS, S. L.; RAJ, V. S.; ODUBER, M. D.; SCHAPENDONK, C. M.; BODEWES, R.; PROVACIA, L.; STITTELAAR, K. J.; OSTERHAUS, A. D.; HAAGMANS, B. L. Metagenomic analysis of the ferret fecal viral flora. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71595, 2013.

SMITS, S. L.; SCHAPENDONK, C. M.; VAN BEEK, J.; VENNEMA, H.; SCHURCH, A. C.; SCHIPPER, D.; BODEWES, R.; HAAGMANS, B. L.; OSTERHAUS, A. D.; KOOPMANS, M. P. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 7, p. 1218-1222, 2014.

SMITS, S. L.; VAN LEEUWEN, M.; SCHAPENDONK, C. M.; SCHURCH, A. C.; BODEWES, R.; HAAGMANS, B. L.; OSTERHAUS, A. D. Picobirnaviruses in the human respiratory tract. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 9, p. 1539-1540, 2012.

SUN, G.; ZANG, Q.; GU, Y.; NIU, G.; DING, C.; ZHANG, P. Viral metagenomics analysis of picobirnavirus-positive feces from children with sporadic diarrhea in China. **Archives of virology**, v. 161, n. 4, p. 971-975, 2016.

TAKIUCHI, E.; MACEDO, R.; KUNZ, A. F.; GALLEGOS, J. C.; DE MELLO, J. L.; OTONEL, R. A.; ALFIERI, A. A. Electrophoretic RNA genomic profiles of Brazilian Picobirnavirus (PBV) strains and molecular characterization of a PBV isolated from diarrheic calf. **Virus research**, v. 211, p. 58-63, 2016.

TAMEHIRO, C. Y.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, C.; ALFIERI, A. A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 344-348, 2003.

VALLE, M. C.; MARTINEZ, L. C.; FERREYRA, L. J.; GIORDANO, M. O.; ISA, M. B.; PAVAN, J. V.; DE BOCCARDO, G.; MASSARI, P. U.; NATES, S. V. Viral agents related to diarrheic syndrome in kidney transplanted patients. **Medicina (B Aires)**, v. 61, n. 2, p. 179-182, 2001.

VIRAL ZONE. **Picobirnavirus**. Disponível em: < <https://viralzone.expasy.org/602>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

WAKUDA, M.; PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. **Journal of virological methods**, v. 126, n. 1-2, p. 165-169, 2005.

WILBURN, L.; YODMEEKLIN, A.; KOCHJAN, P.; SAIKRUANG, W.; KUMTHIP, K.; KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N. Molecular detection and characterization of picobirnaviruses in piglets with diarrhea in Thailand. **Archives Virology**, 2017.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; TSANG, A. K. L.; JOSEPH, M.; WONG, E. Y. M. Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses. **Virology**, v. 473, p. 117–125, 2014.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; BAI, R.; TENG, J. L.; LEE, P.; MARTELLI, P.; HUI, S. W.; YUEN, K. Y. Complete genome sequence of a novel picobirnavirus, otarine picobirnavirus, discovered in California sea lions. **Journal of virology**, v. 86, n. 11, p. 6377-6378, 2012.

WOO, P. C.; TENG, J. L.; BAI, R.; WONG, A. Y.; MARTELLI, P.; HUI, S. W.; TSANG, A. K.; LAU, C. C.; AHMED, S. S.; YIP, C. C.; CHOI, G. K.; LI, K. S.; LAM, C. S.; LAU, S. K.; YUEN, K. Y. High Diversity of Genogroup I Picobirnaviruses in Mammals. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1886, 2016.

ZHANG, T.; BREITBART, M.; LEE, W. H.; RUN, J. Q.; WEI, C. L.; SOH, S. W.; HIBBERD, M. L.; LIU, E. T.; ROHWER, F.; RUAN, Y. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. **PLoS Biology**, v. 4, n. 1, p. 108-118, 2006.

ZHANG, S.; ZAI, R.; FENG, R.; ZHANG, H.; LOI, L. Detection and evolutionary analysis of picobirnaviruses in treated wastewater. **Micorbial biotechnology**, v. 8, p. 474 – 482, 2014.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

- Investigar a ocorrência de PBV em fezes de suínos e de humanos contactantes em granjas suinícolas da região oeste do Paraná.
- Identificar e realizar a caracterização molecular das estirpes de PBV detectadas em fezes de humanos e de suínos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o PBV em amostras fecais de suínos e dos humanos contactantes por meio das técnicas eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e RT-PCR;
- Avaliar a frequência de ocorrência do PBV em suínos e humanos;
- Avaliar a distribuição da infecção pelo PBV em suínos de acordo com a categoria animal;
- Realizar a caracterização molecular e comparar filogeneticamente as sequências nucleotídicas de PBV isolados de suínos e humanos.

4 CAPÍTULO 1 – DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM FEZES DE SUÍNOS E HUMANOS CONTACTANTES EM GRANJAS SUINÍCOLAS DA REGIÃO OESTE DO PARANÁ

RESUMO:

Os *Picobirnavirus* (PBV) constituem um grupo de vírus emergentes pertencente à família *Picobirnaviridae*. São vírus de genoma de RNA fita dupla bissegmentado (dsRNA), envolto por capsídeo icosaédrico e não-envelopado. O PBV pode infectar diversas espécies hospedeiras, incluindo humanos e outros mamíferos marinhos e terrestres, aves e répteis. Diversos estudos moleculares têm sugerido a transmissão interespecie do PBV, devido à alta identidade observada entre estirpes virais de diferentes espécies hospedeiras, destacando o possível potencial zoonótico do PBV entre suínos e humanos. Contudo, a maioria dos estudos comparou sequências de PBV obtidas de suínos e humanos sem nenhuma relação epidemiológica entre eles. Este estudo propõe a investigação de ocorrência e caracterização molecular de PBV a partir de amostras fecais de suínos de cinco granjas comerciais, bem como dos humanos contactantes com os animais das respectivas granjas. Foram analisadas 197 amostras de fezes de suínos, de diferentes idades e categorias, e 12 amostras de fezes de humanos. O PBV foi detectado em 28,4% (56/197) e 41,6% (5/12) pela EGPA e 42,6% (84/197) e 16,7% (2/12) pela RT-PCR em suínos e humanos, respectivamente. A frequência de detecção do PBV por EGPA foi significativa em matrizes em lactação em comparação aos leitões e fêmeas gestantes. Os produtos amplificados baseados na sequência parcial do gene RdRp foram em sua maioria caracterizados como genogrupo I do PBV (PBV-GI), sendo uma amostra de humano e uma amostra de suíno positivas para o genogrupo II (PBV-GII). Devido à baixa qualidade das sequências, não foi possível realizar a caracterização molecular entre isolados de PBV humano e suínos relacionados (contactantes entre si). Porém, a análise filogenética da sequência parcial de PBV-GII humano obtido neste estudo, demonstrou 100% de identidade aminoacídica com PBV de espécies heterólogas (suínos e macaco rhesus) e de localidades distintas. Este é o primeiro estudo a propor uma análise comparativa entre espécies contactantes entre si no mesmo espaço de tempo/local. A alta frequência de detecção encontrada reforça a necessidade de continuidade dos estudos que avaliem a patogênese do PBV e elucidar o papel desses vírus em populações expostas à infecção.

Palavras-chave: Picobirnavírus, humano, suíno, genogrupo I, genogrupo II.

4.1 INTRODUÇÃO

O *Picobirnavirus* (PBV) constitui o único gênero pertencente à família *Picobirnaviridae*, e possui duas espécies reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV): *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus* (DELMAS et al., 2019).

Os PBV são vírus emergentes, não envelopados, com genoma constituído por dois segmentos de RNA fita dupla, envoltos por capsídeo icosaédrico. O segmento 1 (2,2 a 2,7kb) codifica a proteína de capsídeo e o segmento 2 (1,2 a 1,9kb) a enzima viral RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (NATES, GATTI e LUDERT, 2011). Devido à alta variabilidade genética da RdRp, os PBVs são caracterizados em genogrupo I (GI) e genogrupo II (GII) (ROSEN et al., 2000; BANYAI et al., 2003). Recentemente, uma estirpe de picobirnavírus humano encontrado por metagenômica, demonstrou baixa identidade de aminoácidos do gene que codifica a RdRp, quando comparado aos GI e GII, sendo sugerida a incorporação do PBV genogrupo III (GIII) (SMITS et al., 2014).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e RT-PCR são as técnicas laboratoriais rotineiramente utilizadas para o diagnóstico do PBV. Enquanto a EGPA requer altas concentrações de vírus na amostra biológica, a RT-PCR apresenta alta sensibilidade e possibilita a diferenciação dos PBV em genogrupos com a utilização de *primers* específicos e posterior sequenciamento genético (ROSEN et al., 2000).

O PBV foi descrito pela primeira vez no Brasil em humanos (PEREIRA, 1988a), sendo atualmente descrito em uma ampla variedade de hospedeiros mamíferos terrestres e marinhos, répteis, aves e também em águas residuais de estações de tratamento de esgoto em diferentes países do mundo (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014; MALIK et al., 2014).

Alguns estudos relacionam a infecção pelo PBV a sinais clínicos de gastroenterite, sendo detectado em fezes diarreicas humanas e de diferentes espécies animais (CASCIO et al., 1996; BHATTACHARYA et al., 2006; MONDAL et al., 2014; SMITS et al., 2014; WILBURN et al., 2017). Entretanto, a presença do PBV também foi demonstrada em fezes não-diarreicas (MASACHESSI et al., 2012; TAKIUCHI et al., 2016).

Além disso é especulada a característica oportunista do vírus. Em humanos, o PBV foi encontrado em pacientes submetidos a tratamento imunossupressor

prolongado e em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CUNLIFFE et al., 1996; GIORDANO et al., 1998; GIORDANO et al., 1999).

A relação imunossupressão e PBV também já foi observada em suínos, sendo que a maior excreção viral foi evidenciada nos períodos em que ocorre maior estresse fisiológico, como final de gestação e período de amamentação (MARTINEZ et al., 2010).

Diante desses resultados controversos, permanece inconclusivo o papel patogênico do PBV (LEEUEWEN et al., 2010). A transmissão interespecie de PBV já foi sugerida em estudos epidemiológicos e de caracterização molecular, baseado na estreita relação genética entre estirpes detectadas em diferentes espécies hospedeiras (BANYAI et al., 2008; GIORDANO et al., 2011; GANESH et al., 2012).

Em estudo realizado na Argentina, sequências parciais do gene RdRp de PBV encontradas em suínos naquela localidade, demonstraram alta identidade com sequências de PBV humano disponíveis nas bases públicas de dados, obtendo até 100% de identidade (GIORDANO, 2011). Outro estudo realizado na Índia, comparando sequências parciais do gene RdRp de PBV identificados em humanos e em suínos da Hungria, verificou identidade de até 92% para nucleotídeos e 95% de identidade para aminoácidos, sugerindo que as estirpes de ambas espécies hospedeiras possuem ancestral comum (GANESH et al., 2010). Entretanto, até o nosso conhecimento, nenhum estudo comparou sequências genômicas de PBV obtidas de diferentes espécies hospedeiras e contactantes entre si.

O objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de PBV em fezes de suínos e humanos contactantes de granjas suinícolas da região oeste do Paraná e realizar a caracterização molecular destes achados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Granjas e coleta de amostras biológicas - O estudo foi realizado no período entre fevereiro e outubro de 2018, em cinco granjas do Paraná, incluindo os municípios de Palotina, Marechal Cândido Rondon, Mercedes e Entre Rios do Oeste.

Foram coletadas 197 amostras fecais de suínos de diferentes categorias e condições fisiológicas: leitões ($n=56$), fêmeas prenhes ($n=45$), fêmeas com leitões ($n=87$) e animais doentes e de descarte ($n=9$). A distribuição das amostras por granja e categoria animal está especificada na TABELA 1.

As 12 amostras fecais humanas incluídas neste estudo foram cedidas voluntariamente pelos trabalhadores rurais contactantes com os suínos originários da Granja 2 ($n=2$), Granja 3 ($n=4$), Granja 4 ($n=2$) e Granja 5 ($n=4$).

TABELA 1 - DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS DE ACORDO COM A PROPRIEDADE, CATEGORIA E CONDIÇÃO FISIOLÓGICA DOS ANIMAIS

Categoria animal	Granja					Total
	1	2	3	4	5	
Leitão	38	12	3	2	1	56
Fêmeas prenhes	0	31	12	1	1	45
Fêmeas com leitões	0	0	26	19	42	87
Descarte/doentes	5	0	4	0	0	9
Total	43	43	45	22	44	197

Fonte: A autora (2019)

Aprovação pelos Comitês de Ética - O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, sob o protocolo nº 33/2016, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná – SCS/UFPR, sob o nº CAAE 91290418.8.0000.0102.

Extração bruta das fezes - As amostras foram diluídas em tampão pH 7,4 (Tris-HCl 0,089 mM /L, CaCl₂ 0,15 mM/L, com concentração final de 10 a 20% (peso/volume), homogeneizadas por agitação mecânica vigorosa, centrifugadas a 3.000 rpm por 5 minutos, tendo o sobrenadante recolhido e submetido a extração do ácido nucleico viral.

Extração do ácido nucleico viral – Para realização da extração do ácido nucleico viral foi utilizada a técnica de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), associada à técnica de sílica/isotiocianato de guanidina, adaptado de Alfieri et al. (2006). As alíquotas de suspensões fecais diluídas foram tratadas com dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% e submetidas a banho-maria a 56°C por 30 minutos. Posteriormente, adicionou-se a solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, sucedida de agitação mecânica e incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos, e centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). A fração aquosa foi recuperada e submetida ao tratamento com sílica e isotiocianato de

guanidina, adaptado da técnica descrita por BOOM et al. (1990). Os ácidos nucleicos extraídos foram eluídos utilizando água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) autoclavada e mantidos congelados a -20°C até o momento do uso. Foi utilizada água DEPC como controle negativo e amostras conhecidamente positivas para rotavírus bovino espécie A (RVA) como controle positivo, para a certificação e validação dos procedimentos de extração.

Eletroforese em gel de poli-acrilamida (EGPA) - Os ácidos nucleicos extraídos foram submetidos à EGPA a 7,5% seguida pela coloração por nitrato de prata para a detecção e avaliação dos perfis eletroforéticos do RNA bissegmentado do PBV, de acordo com metodologia descrita por Herring et al. (1982) e Pereira et al. (1988b).

RT-PCR para detecção de *Picobirnavirus* Genogrupo I - Todas as amostras de fezes também foram submetidas à RT-PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) PicoB25 (5' TGG TGT GGA TGT TTC 3') e PicoB43 (5' A(GA)T G(CT)T GGT CGA ACT T 3') para amplificar um fragmento de 201 pb do gene RdRp (segmento 2), específicos para o GI do PBV (ROSEN et al., 2000), segundo o protocolo de Takiuchi et al. (2016).

RT-PCR para detecção de *Picobirnavirus* Genogrupo II - As amostras fecais de humanos foram submetidas à RT-PCR para detecção do PBV-GII. Também foram testados todos os animais da granja em que foi detectado o PBV-GII em humano contactante. Foram utilizados os *primers* Pico B23 (5' CGG TAT GGA TGT TTC 3') e Pico B24 (3' AAG CGA GCC CAT GTA 5'), para amplificar um segmento de 369 pb do gene RdRp (segmento 2), específico para o GII do PBV, seguindo o protocolo de Rosen et al. (2000).

Análise dos produtos da RT-PCR - Alíquotas contendo 4 µL dos produtos da RT-PCR foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE pH 8,4 (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA), sob voltagem constante (100V) durante aproximadamente 60 minutos. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg/mL para posterior visualização dos *amplicons* em transiluminador UV e fotodocumentação digital (Fotodocumentador L-Pix Touch – Locus).

Sequenciamento - Os produtos amplificados foram purificados com o kit PureLink® Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen, 17 Carlsbad, CA, USA), quantificados com fluorômetro Qubit™ (Invitrogen Life Technologies, USA) e sequenciados com BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) no analisador genético

automático modelo ABI 3500 (Applied Biosystems®), utilizando os *primers forward* e *reverse*.

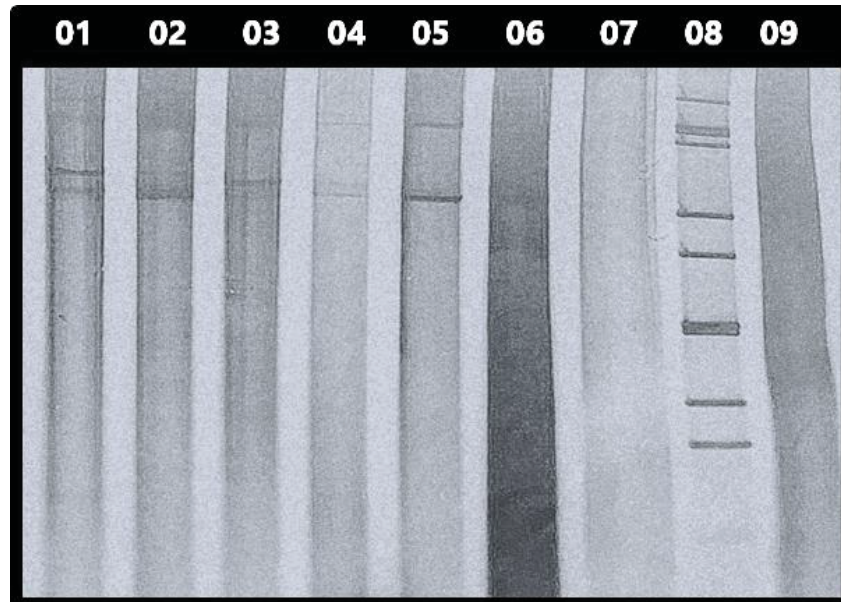
Análise filogenética - A qualidade das sequências obtidas foi avaliada pelo programa Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) e a identidade dos produtos foi comparada com as sequências depositadas em bases públicas de dados (GenBank) utilizando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). As sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas com sequências de PBV de diferentes espécies hospedeiras através do programa ClustalW. Os alinhamentos foram editados e corrigidos manualmente no programa BioEdit versão 7.2.6.1. Para avaliação filogenética foram incluídas sequências parciais do gene RdRp de PBV-GI, PBV-GII e PBV-GIII isolados de diferentes espécies hospedeiras. A árvore filogenética foi construída com o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR, STECHER e TAMURA, 2016) utilizando o algoritmo *Maximum Likelihood* a partir de distâncias estimadas pelo método de Tamura 3 parâmetros com taxas de sítios invariáveis (I) e distribuição gama (G). A robustez da inferência filogenética foi avaliada através do método de *bootstrapping* (com base em 1.000 réplicas).

Análise estatística - Para verificar a associação entre os resultados obtidos por categoria animal foi utilizado o teste do qui-quadrado em tabelas de contingência considerando como nível de significância valor de $p < 0,05$. Para garantir maior relevância estatística, foram testadas apenas as categorias com cinco ou mais aparições. Para a realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* Vassarstats (<http://vassarstats.net/>).

4.3 RESULTADOS

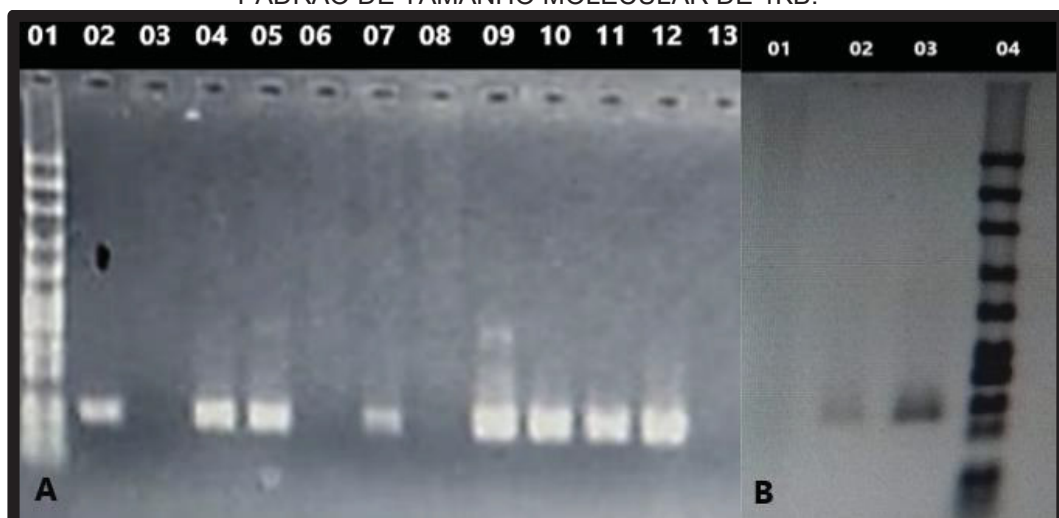
A presença do PBV foi confirmada nas fezes de suínos em todas as granjas amostradas. Das 197 amostras analisadas, o PBV foi detectado em 57,4% (113/197), sendo considerado todos os resultados positivos obtidos pelas técnicas EGPA e/ou RT-PCR para PBV GI. As FIGURAS 1 e 2 demonstram os resultados positivos obtidos pelas respectivas técnicas.

FIGURA 1 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (EGPA) SEGUIDA PELA COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA. CANALETA 01: AMOSTRA POSITIVA DE PBV HUMANO *LARGE PROFILE*; CANALETAS 02 A 05: AMOSTRAS PBV POSITIVAS PARA PBV SUÍNO *LARGE PROFILE*; CANALETAS 06 E 07: AMOSTRAS PBV NEGATIVAS; CANALETA 08: PERFIL ELETROFORÉTICO DE ROTAVÍRUS A BOVINO (CONTROLE POSITIVO DE EXTRAÇÃO E EGPA) E CANALETA 09: CONTROLE NEGATIVO.



FONTE: A autora (2018)

FIGURA 2 – A) RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 201PB DO GENE RDRP DO PBV-GI. CANALETA 01: PADRÃO DE TAMANHO MOLECULAR DE 1KB; CANALETAS 02, 04, 05, 07, 09, 10, 11, 12 E 13: AMOSTRAS PBV-GI DE SUÍNO POSITIVAS; CANALETAS 03, 06 E 08: AMOSTRAS PBV-GI NEGATIVAS; CANALETA 13: CONTROLE NEGATIVO. B) RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 369PB DO GENE RDRP DO PBV-GII. CANALETA 01: CONTROLE NEGATIVO; CANALETAS 02 E 03: AMOSTRA PBV-GII DE HUMANO POSITIVA; CANALETA 04: PADRÃO DE TAMANHO MOLECULAR DE 1KB.



FONTE: A autora (2018)

A frequência de PBV variou de 34,9% a 79,5% nas granjas avaliadas. A distribuição de resultados positivos por granja e técnica diagnóstica utilizada está indicada na TABELA 2.

TABELA 2 – DISTRIBUIÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA PBV SUÍNO DE ACORDO COM A GRANJA E A TÉCNICA DIAGNÓSTICA UTILIZADA.

Granja	Nº de amostras	Amostras PBV positivas			TOTAL (%)
		Apenas EGPA (%)	Apenas RT-PCR PBV GI (%)	Ambas (%)	
Granja 1	43	0	15 (34,9)	0	15 (34,9)
Granja 2	43	7 (16,3)	16 (37,2)	4 (9,3)	27 (62,8)
Granja 3	45	10 (22,2)	9 (20)	9 (20)	28 (62,2)
Granja 4	22	6 (27,3)	1 (4,5)	1(4,5)	8 (36,4)
Granja 5	44	6 (13,6)	16 (36,4)	13 (29,5)	35 (79,5)
TOTAL	197	29 (14,7)	57 (28,9)	27 (13,7)	113 (57,4)

Fonte: A autora (2019)

Ao analisarmos a distribuição dos resultados positivos para PBV de acordo com a categoria dos animais e a técnica diagnóstica, a maior frequência (44,8%) de detecção com significância estatística ocorreu nas fezes de fêmeas lactantes, em comparação aos leitões e fêmeas prenhes, quando utilizada a técnica EGPA. Entretanto não foi observada significância estatística quando analisados os resultados obtidos pela RT-PCR (TABELA 3).

TABELA 3 – DISTRIBUIÇÃO DE POSITIVIDADE PARA O PBV POR CATEGORIA ANIMAL, DE ACORDO COM A TÉCNICA UTILIZADA.

Categoria animal (nº de animais)	Amostras PBV positivas	
	EGPA	RT-PCR GI
Leitão (n=56)	7 (12,5%) ^a	19 (33,9%) ^a
Fêmeas prenhes (n=45)	9 (20%) ^a	21 (46,7%) ^a
Fêmeas lactantes (n=87)	39 (44,8%) ^b	38 (43,7%) ^a
Descarte/doentes (n=9) *	1 (10%)	5 (50%)
Total (n=197)	56 (27,6%)	83 (40,9%)

$\chi^2=19,65$ $p= <0.0001$

Letras minúsculas distintas na mesma coluna indicam diferença estatística significativa

*categoria não incluída na análise estatística

Fonte: A autora (2019)

Das 12 amostras de fezes de humanos provenientes dos trabalhadores rurais contactantes com os suínos, o genoma bissegmentado do PBV foi visualizado em 41,6% (5/12) delas pela EGPA, representativas dos trabalhadores das Granjas 3 (n=3) e 5 (n=2). Quando as mesmas 12 amostras foram submetidas à RT-PCR para o PBV-GI, apenas uma foi amplificada (*amplicon* de 201 pb) com a utilização dos *primers* GI específicos (ROSEN et al., 2000).

Na sequência, todas as amostras humanas foram testadas para a detecção do PBV-GII, utilizando *primers* específicos para amplificar um fragmento de 369 pb do gene RdRp. Apenas uma amostra, referente a um contactante com os animais da Granja 3, revelou ser positiva para PBV-GII (FIGURA 2B). Ambas as amostras positivas para PBV-GI e PBV-GII estavam inclusas entre aquelas previamente triadas como positivas pela EGPA.

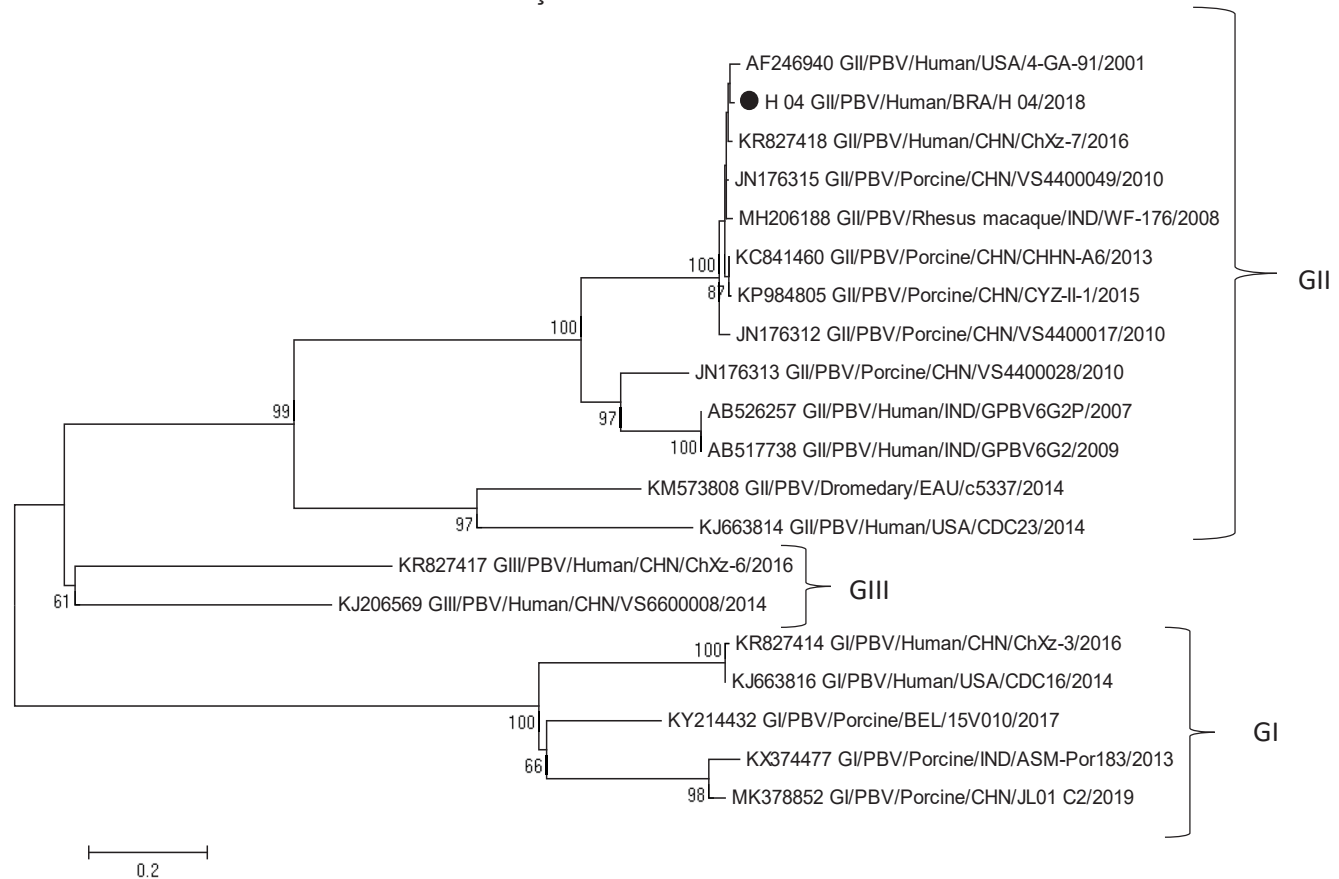
A partir deste resultado, todas as amostras de suínos da Granja 3, ou seja, mesma propriedade onde foi detectado o PBV GII em um humano contactante, foram testadas para o referido genogrupo. Assim, das 46 amostras de suínos da Granja 3, foi detectada uma amostra positiva para PBV-GII.

Foram selecionadas 22 amostras de suínos que geraram banda única de 201 pb e de boa intensidade para o sequenciamento genético. Na análise preliminar das sequências obtidas e confrontadas com outras sequências depositadas em bancos de dados públicos, foi confirmada a identidade de todos os produtos amplificados como PBV-GI. Entretanto, nenhuma amostra apresentou qualidade satisfatória para proceder a análise filogenética.

Das duas amostras humanas positivas pela RT-PCR, apenas a sequência nucleotídica do fragmento obtido com os *primers* PBV-GII demonstrou qualidade para inferência filogenética. A sequência de PBV-GII de humano obtida neste estudo recebeu a denominação H_04.

Para a construção da árvore filogenética, foram utilizadas sequências de PBV provenientes de outras espécies como suínos, humanos, macaco rhesus e dromedário disponíveis em bases públicas de dados. Os números de acesso do GenBank das sequências estão indicados na FIGURA 3.

FIGURA 3 - RELAÇÃO FILOGENÉTICA ENTRE VARIANTES GENÔMICAS DE PBV-GI, PBV-GII E PBV-GIII, BASEADAS EM 356 NUCLEOTÍDEOS DO GENE RDRP (SEGMENTO 2). A SEQUÊNCIA OBTIDA NESTE ESTUDO ESTÁ INDICADA PELO SÍMBOLO ●. A ÁRVORE FILOGENÉTICA FOI CONSTRUÍDA UTILIZANDO O MÉTODO *MAXIMUM LIKELIHOOD*, E O MODELO EVOLUTIVO *TAMURA 3* PARÂMETROS COM 1000 REPETIÇÕES DE *BOOTSTRAP*. OS VALORES DE *BOOTSTRAP* SÃO INDICADOS PRÓXIMOS AOS NÓS. AS BARRAS REPRESENTAM UNIDADES DE SUBSTITUIÇÃO POR NUCLEOTÍDEO.



A árvore filogenética mostrou a formação de três clados, agrupando distintamente os três genogrupos de PBV (GI, GII e GIII). A amostra do presente estudo (H-04) agrupou no mesmo ramo filogenético juntamente com outras sequências PBV-GII de suínos e macaco rhesus.

A análise da matriz de identidade dos nucleotídeos demonstrou alta identidade entre a estirpe de PBV do presente estudo e amostras de diferentes localidades e espécies. As maiores identidades foram observadas com amostras de suíno e humano (JN176315 e KR827418 respectivamente), com 98%, sendo ambas da China. Apresentou ainda 97% de identidade com a estirpe MH206188, de macaco rhesus da Índia e com a amostra referência 4-GA-91 (AF246940) de PBV-GII humano. A matriz de identidade entre as sequências parciais de nucleotídeos do gene RdRp do PBV incluídas neste estudo é apresentada no APÊNDICE F.

A análise da matriz de identidade entre as sequências deduzidas de aminoácidos, a amostra H-04 apresentou 100% de identidade com as sequências de PBV-GII provenientes de suínos (KC841460; JN176315; KP984805) e macaco rhesus (MH206188) (APÊNDICE G).

4.4 DISCUSSÃO

A frequência de detecção do PBV obtida no presente estudo de 57,4% (113/197), demonstra a alta taxa de infecção nos suínos de granjas comerciais do oeste do Paraná. A presença deste vírus já foi relatada em hospedeiro ovino e bovino provenientes da mesma mesorregião deste estudo (TAKIUCHI et al., 2016; KUNZ et al., 2018). Entretanto, no Brasil, estudos epidemiológicos envolvendo o PBV em suínos são escassos; limitados a diagnósticos realizados somente com a EGPA (GATTI et al., 1989; ALFIERI et al., 1994).

Nossos resultados demonstraram maior detecção da RT-PCR (42,6%) quando comparada à EGPA (28,4%) para a detecção do PBV, contudo observou-se superioridade da EGPA (27,3%) com relação à RT-PCR (4,5%) na granja 4. A baixa sensibilidade do segundo método é amplamente relatada na literatura, variando taxas de positividade de 0,4 a 27% na EGPA, e de 8,5 a 60% na RT-PCR (PONGSUWANNA et al., 1996; BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; RIBEIRO SILVA et al., 2014; KYLLA et al., 2017; WILBURN et al., 2017). Apesar da baixa sensibilidade, a EGPA apresenta como vantagem a possibilidade de detecção de todos os genogrupos de PBV, em contraste à RT-PCR que depende de *primers* PBV genogrupo específicos (ROSEN et al., 2000; NATES, GATTI e LUDERT, 2011; GANESH et al., 2012).

Conforme demonstrado na TABELA 3, a infecção pelo PBV está distribuída em todas as categorias animais estudadas (leitões, fêmeas prenhes, fêmeas lactantes e animais de descarte/doentes) com uma frequência de detecção significativa ($p < 0,0001$) em fêmeas lactantes pela EGPA. Considerando a baixa sensibilidade da EGPA, este resultado merece atenção pois demonstra que a replicação do PBV pode ser mais intensa nas porcas em lactação, resultando na excreção do vírus em altos títulos e, portanto, detectável pela técnica. Estima-se que a concentração de PBV nas fezes destes animais esteja acima de 10^8 partículas por mL, considerando que este foi o limite de detecção do rotavírus, cujo genoma também é RNA segmentado, por EGPA em amostras fecais humanas (KOHNO et al., 2000).

Outros estudos também já demonstraram a presença do PBV em diferentes categorias e faixas etárias de suínos. Chen et al. (2014) encontraram o PBV em todas as categorias testadas, com taxas que variaram entre 13,3 a 25,7% por RT-PCR, sendo os leitões desmamados e as porcas as categorias mais acometidas. Martinez et al. (2010) relataram 0 a 38,02% de positividade por EGPA entre diferentes categorias, sendo mais frequente nas fêmeas em lactação, o que corrobora os nossos resultados. Isto sugere fortemente que estados de parto e lactação podem gerar estresse fisiológico, que estabelece condições necessárias para a alta replicação e excreção viral.

As propriedades das coletas eram todas granjas comerciais de produção intensiva, sendo quatro delas unidades produtoras de leitões desmamados (UPD) e uma granja de ciclo completo (Granja 1). As granjas 1 e 2 apresentam um sistema de manejo considerado ótimo e alto desempenho de produção. As propriedades 3 e 4 foram avaliadas como manejo regular a ruim, e a granja 5 com manejo regular. Conforme demonstrado na TABELA 2, os resultados variaram de 34,9% a 79,5% de positividade entre as propriedades. Inesperadamente, a propriedade com maior número de amostras positivas (Granja 5) não possuía o pior desempenho de manejo e de índices zootécnicos. Porém, era constituída predominantemente por fêmeas lactantes, a categoria mais acometida neste estudo. Resultados semelhantes foram reportados por Martinez et al. (2010) em um estudo longitudinal realizado na Argentina. Neste estudo, o maior período de detecção do PBV correspondeu ao final da gestação e durante a lactação em porcas, sugerindo que as condições de estresse fisiológico ou gerados pelo manejo dos animais podem favorecer a maior replicação e excreção viral. A associação do PBV como um agente oportunista foi evidenciada também em humanos, com resultados significativos em indivíduos imunossuprimidos e infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GROHMANN et al., 1993; GONZALEZ et al., 1998; GIORDANO et al., 1999; BHATTACHARYA et al., 2006;).

A relação causal do PBV com diarreia ainda é controversa. Alguns estudos descrevem a presença do vírus em fezes diarreicas (GATTI et al., 1989; SUN et al., 2016; KYLLA et al., 2017), enquanto outros o detectaram em fezes de consistência normal (LUDERT et al., 1991; CARRUYO et al., 2008; MARTINEZ et al., 2010; TAKIUCHI et al., 2016; WILBURN et al., 2017; KUNZ et al., 2018). Uma vez que nossa amostragem foi constituída apenas por fezes de suínos com consistência normal, não é possível inferir qualquer conclusão sobre isso. No entanto, diante da alta taxa de

detecção encontrada por EGPA, acreditamos que o PBV não seja um patógeno primário da diarreia.

Nesse estudo, 22 produtos amplificados por RT-PCR para PBV-GI foram enviados para sequenciamento genético. Com o auxílio do algoritmo BLAST, em todas as sequências foi confirmada a identidade com o gene RdRp de PBV-GI. Entretanto, na análise de qualidade das bases pelo cromatograma e Phred, nenhuma sequência foi apropriada para proceder com a análise filogenética. Uma possível explicação para este insucesso é a incidência de coinfeções por PBV divergentes. A alta variabilidade no genoma desses vírus é frequentemente relatada em PBV isolados de suínos (BÁNYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008). Bányai et al. (2008) demonstraram a alta taxa de mutações no gene RdRp dos PBVs, sugerindo que esses vírus existem como *quasispecies* no trato intestinal dos hospedeiros. Outros autores também demonstraram dificuldade na obtenção de sequências com qualidade satisfatória (TAKIUCHI et al., 2016), sendo necessária a clonagem dos amplificados (WOO et al., 2016; KYLLA et al., 2017). Ressalta-se que este vírus não se adapta em sistemas de cultivo de células *in vitro*, e também não há métodos imunodiagnósticos para sua detecção e/ou caracterização (FREGOLENTE et al., 2009).

O PBV tem sido detectado em uma ampla gama de espécies hospedeiras, incluindo os seres humanos (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014). A descoberta de estirpes com completa identidade de sequências nucleotídicas entre PBV isolados de suínos e humanos remeteu à possibilidade da transmissão interespecie e ao potencial zoonótico desse vírus (BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; GANESH et al., 2010; GIORDANO et al., 2011; GANESH et al., 2012). No entanto, estes estudos compararam sequências de PBV obtidas de suínos e humanos sem qualquer relação epidemiológica entre eles. O presente trabalho teve como intuito principal validar esta hipótese, a partir da análise de amostras fecais de suínos e dos humanos contactantes, envolvidos com o manejo diário dos animais. No entanto, infelizmente, não obteve-se sequência de qualidade nas amostras suínas, conforme mencionado anteriormente. Das 12 amostras de humanos avaliadas, cinco delas foram positivas na EGPA, representativas dos colaboradores das Granjas 3 e 5. Nenhum participante relatou qualquer situação imunossupressora ou episódio de diarreia no momento da coleta ou nos dias precedentes. Apenas duas amostras revelaram-se positivas na Granja 5 e Granja 3, quando submetidas à RT-PCR para o

PBV GI e GII, respectivamente, entre as quais somente a sequência PBV-GII humano (PBV H-04) foi satisfatória para realizar a filogenia e caracterização molecular.

Assim, devido ao insucesso na qualidade do sequenciamento de PBV-GI de suínos, optou-se por testar todos os animais amostrados da Granja 3 para o PBV-GII, sendo revelada uma amostra positiva e confirmada pelo BLAST, porém sem qualidade no sequenciamento. Esta é a primeira detecção do PBV-GII, em suínos e humanos no Brasil.

O insucesso na amplificação do material genético pela RT-PCR pode ser atribuído à possível degradação do RNA viral e/ou presença de contaminantes nas fezes que atuam como inibidores das polimerases (WILSON, 1997). Outro fator limitante é a dificuldade de amplificação do PBV-GII, assim como demonstrado em outro estudo realizado com bovinos no Brasil (NAVARRO et al., 2018), que atribuíram a falha de detecção possivelmente aos *primers* utilizados, devido à alta variabilidade genética deste genogrupo. A alta variabilidade genética foi observada no RNA de diferentes PBV-GI isolados de um único suíno, decorrente de diversas mutações pontuais não sinônimas. (BANYAI et al., 2008). Além disso, devido à natureza segmentada do genoma deste vírus, é passível o rearranjo dos segmentos (*reassortments*) quando há coinfeções de diferentes estirpes de PBV (BANYAI et al., 2003; PARRISH et al., 2008; NATES, GATTI E LUDERT, 2011).

A robustez da filogenia foi suportada com a segregação dos genogrupos distintos de PBV (GI, GII e GIII) em três clados com altos valores de *bootstrap* (FIGURA 3).

A amostra PBV-GII H-04, obtida neste estudo, agrupou-se juntamente com outros isolados de PBV-GII, incluindo a amostra referência AF246940, com 97% e 99% de identidade de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente. Uma das dificuldades encontradas foi o pequeno número de sequências disponíveis em bases públicas de dados para este genogrupo, que é ainda muito inferior ao PBV-GI. Isto deve-se ao menor número de estudos envolvendo este genogrupo, associado à falha de detecção pelos *primers* GII disponíveis, ou até mesmo pela real predominância mundial de PBV-GI em comparação ao GII (GANESH et al., 2012). Além disso, muitas sequências disponíveis têm tamanho inferior ao obtido neste estudo. Para maior confiabilidade das análises, foram comparadas e alinhadas apenas sequências com um tamanho mínimo de 356 nucleotídeos.

A identidade nucleotídica e de aminoácidos entre as estirpes de PBV-GI avaliados neste estudo, variou de 43 a 98% e 27 a 100%, respectivamente. Observa-se na árvore filogenética a diversidade genética entre PBVs detectados em humanos, em diferentes localidades, bem como a identidade entre estirpes de diferentes espécies, como humanos e suínos. A amostra H_04 apresentou 98% de identidade nucleotídica com amostra de PBV suíno (JN176315) da China. Da mesma forma, análises anteriores realizadas em amostras de humanos, apresentaram valores de identidade de nucleotídeos semelhantes, quando alinhadas a estirpes de PBV suíno e equino, variando de 85 a 100% (CARRUYO et al., 2008; GANESH et al., 2010; GANESH et al., 2011; GIORDANO et al., 2011).

Embora não tenhamos conseguido sequências de qualidade no hospedeiro suíno, a completa homologia das sequências parciais de aminoácidos deduzidos oriundas de PBV de espécies heterólogas (FIGURA 4), sugerem a transmissão interespecie, envolvendo estirpes de diferentes localizações geográficas, e isoladas em diferentes épocas. Resultados semelhantes foram observados em estudos anteriores (BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; GIORDANO et al., 2011 e GANESH et al., 2010).

As amostras de PBV suíno JN176312, JN176313 e JN176315 são provenientes de trato respiratório dos animais. Seu agrupamento com estirpes provenientes de amostras de fezes expande o conhecimento sobre o tropismo do vírus (SMITS et al., 2011).

4.5 CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que a infecção pelo PBV está amplamente distribuída em hospedeiros suínos de diferentes categorias e diferentes granjas de criação comercial, sendo a categoria de fêmeas lactantes a mais acometida. Foi evidenciada também a circulação do vírus nos humanos contactantes com estes animais. Não foi possível investigar o potencial zoonótico de amostras de humanos e suínos com vínculo epidemiológico, contudo, a análise filogenética da sequência de PBV humano com estirpes de outras espécies animais revelou alta identidade, sugerindo esta hipótese, como demonstrado anteriormente por outros autores.

Este é o primeiro estudo a realizar a investigação do PBV em hospedeiros suínos e humanos contactantes simultaneamente, para avaliar aspectos moleculares

do vírus e elucidar tópicos sobre a possibilidade de transmissão interespecie e o potencial zoonótico do PBV, sendo descrita a primeira detecção do PBV genogrupo II em suínos e humanos no Brasil.

A compreensão da epidemiologia do vírus pode esclarecer sua patogenia e sua influência na saúde ocupacional. Para isso, deve-se manter uma vigilância rigorosa da circulação viral, principalmente utilizando novas técnicas moleculares.

REFERÊNCIAS – CAPÍTULO 1

- ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical animal health and production**, v. 38, n. 7-8, p. 521-526, 2006.
- ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; FREITAS, J.; SILVA, C.; FREIRE, R.; BARROS, A.; BARREIROS, M.; MULLER, E. Occurrence of Escherichia coli, rotavirus, picobirnavirus and Cryptosporidium parvum in a post weaning diarrhoea focus in swine. **Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 5-7, 1994.
- BANYAI, K.; JAKAB, F.; REUTER, G.; BENE, J.; UJ, M.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. **Archives of virology**, v. 148, n. 12, p. 2281-2291, 2003.
- BANYAI, K.; MARTELLA, V.; BOGDAN, A.; FORGACH, P.; JAKAB, F.; MELEG, E.; BIRO, H.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. **The Journal of general virology**, v. 89, n. 2, p. 534-539, 2008.
- BHATTACHARYA, R.; SAHOO, G. C.; NAYAK, M. K.; RAJENDRAN, K.; DUTTA, P.; MITRA, U.; BHATTACHARYA, M. K.; NAIK, T. N.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHNAN, T. Detection of Genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 229-238, 2006.
- BOOM, R.; SOL, C.; SALIMANS, M.; JANSEN, C.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- CARRUYO, G. M.; MATEU, G.; MARTINEZ, 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.
- CASCIO, A.; BOSCO, M.; VIZZI, E.; GIAMMANCO, A.; FERRARO, D.; ARISTA, S. Identification of Picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. **European Journal of Epidemiology**, v. 12, p. 545-547, 1996.
- CHEN, M.; SUN, H.; LAN, D.; HUA, X.; CUI, L.; YUAN, C.; YANG, Z. Molecular detection of genogroup I and II picobirnaviruses in pigs in China. **Virus Genes**, v. 48, n. 3, p. 553-556, 2014.
- CUNLIFFE, N.A.; GLASS, R.I. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. **The Lancet**, p. 348:1037, 1996.

DELMAS, B., ATTOUI, H., GHOSH, S., MALIK, Y. S., MUNDT, E., VAKHARIA, V. N., AND ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picobirnaviridae, **Journal of General Virology**, v. 100, p. 133–134, 2019.

DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 115–131, 2007.

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

GANESH, B.; BANYAI, K.; MARTELLA, V.; JAKAB, F.; MASACHESSI, G.; KOBAYASHI, N. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. **Reviews in medical virology**, v. 22, n. 4, p. 245-256, 2012.

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, p. 52, 2011.

GANESH, B.; MASACHESSI, G.; MLADENOVA, Z. Animal picobirnavirus. **Virus disease**, v. 25, n. 2, p. 223-238, 2014.

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 : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 511-516, 2010.

GATTI, M. S.; DE CASTRO, A. F.; FERRAZ, M. M.; FIALHO, A. M.; PEREIRA, H. G. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. **Research in veterinary science**, v. 47, n. 3, p. 397-398, 1989.

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

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; RINALDI, D.; ESPUL, C.; MARTINEZ, N.; ISA, M. B.; DEPETRIS, A. R.; MEDEOT, S. I.; NATES, S. V. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. **AIDS research and human retroviruses**, v. 15, n. 16, p. 1427-1432, 1999.

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; RINALDI, D.; GUINARD, S.; NARETTO, E.; CASERO, R.; YACCI, M. R.; DEPETRIS, A. R.; MEDEOT, S. I.; NATES, S. V. Detection of picobirnavirus in HIV-infected patients with diarrhea in Argentina. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association**, v. 18, n. 4, p. 380-383, 1998.

- GONZALEZ, G. G.; PUJOL, F. H.; LIPRANDI, F.; DEIBIS, L.; LUDERT, J. E. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. **Journal of Medical Virology**, v. 55, p. 288–292, 1998.
- GROHMANN, G. S.; GLASS, R. I.; PEREIRA, H. G.; MONROE, S. S.; HIGHTOWER, A. W.; WEBER, R.; BRYAN, R. T. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 1, p. 14-20, 1993.
- HERRING, A.; INGLIS, N.; OJEH, C.; SNODGRASS, D. A.; MENZIES, J. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of clinical microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.
- KNOX, M. A.; GEDYE, K. R.; HAYMAN, D. T. S. The challenges of analysing highly diverse Picobirnavirus sequence data. **Viruses**, v. 10, p. 685-696, 2018.
- KOHNO, H.; AKIHARA, S.; NISHIO, O.; USHIJIMA, H. Development of a simple and rapid latex test for rotavirus in stool samples. **Pediatrics international: official journal of the Japan Pediatric Society**, v. 42, n. 4, p. 395-400, 2000.
- KRISHNAMURTHY, S. R., WANGA, D. Extensive conservation of prokaryotic ribosomal binding sites in known and novel picobirnaviruses. **Virology**, v. 516, p. 108–114, 2018.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- KUNZ, A. F.; POSSATTI, F.; FREITAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; TAKIUCHI, E. High detection rate and genetic diversity of picobirnavirus in a sheep flock in Brazil. **Virus research**, v. 255, p. 10-13, 2018.
- KYLLA, H.; DUTTA, T. K.; ROYCHOUDHURY, P.; MALIK, Y. S.; MANDAKINI, R.; SUBUDHI, P. K. Prevalence and molecular characterization of porcine Picobirnavirus in piglets of North East Region of India. **Tropical animal health and production**, v. 49, n. 2, p. 417-422, 2017.
- LEEUEWEN, M. V.; 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. 10, p. 1787–94, 2010.
- LIMA, D. A.; CIBULSKI, S.P.; TOCHETTO, C.; VARELA, A.P.M.; FINKLER, F.; TEIXEIRA, T.F.; LOIKO, M.R.; CERVA, C.; JUNQUEIRA, D.M.; MAYER, F.Q.; ROEHE, P.M. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. **Virus research**, v. 261, p. 9-20, 2019.

- LUDERT, J. E.; HIDALGO, M.; GIL, F.; LIPRANDI, F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. **Archives of virology**, v. 117, n. 1-2, p. 97-107, 1991.
- MALIK, Y. S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; DHAMA, K.; SHABBIR, M. Z.; GANESH, B.; KOBAYASHI, N.; BANYAI, K. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric Picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-13, 2014.
- MARTINEZ, 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: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 7, p. 984-988, 2010.
- MASACHESSI, G.; MARTINEZ, L. C.; GANESH, B.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, M. B.; IBARS, A.; PAVAN, J. V.; NATES, S. V. Establishment and maintenance of persistent infection by picobirnavirus in greater rhea (*Rhea Americana*). **Archives of virology**, v. 157, n. 11, p. 2075-2082, 2012.
- MONDAL, A.; MAJEE, S. Novel bisegmented virus (picobirnavirus) of animals, birds and humans. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, n. 4, p. 154-158, 2014.
- NATES, S. V.; GATTI, M. S. V.; LUDERT, J. E. The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential. **Future Virology**, v. 6, n. 2, p. 223-235, 2011.
- NAVARRO, J. O.; CANDIDO, M.; ALMEIDA-QUEIROZ, S. R.; BUZINARO, M. G.; LIVONESI, M. C.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. L. M. Genetic diversity of bovine *Picobirnavirus*, Brazil. **Virus genes**, v. 54, p. 724-728, 2018.
- PARRISH, C. R.; HOLMES, E. C.; MORENS, D. M.; PARK, E. C.; BURKE, D. S.; CALISHER, C. H.; LAUGHLIN, C. A.; SAIF, L. J.; DASZAK, P. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 72, n. 3, p. 457-70, 2008.
- PEREIRA, H. G.; FIALHO, A. M.; FLEWETT, T. H.; TEIXEIRA, J. M.; ANDRADE, Z. P. Novel viruses in human faeces. **Lancet**, v. 2, n. 8602, p. 103-104, 1988a.
- PEREIRA, H. G.; FLEWETT, T. H.; CANDEIAS, J. A.; BARTH, O. M. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. **The Journal of general virology**, v. 69, p. 2749-2754, 1988b.
- PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASY, C.; URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1050-1057, 1996.

- RIBEIRO SILVA, R.; BEZERRA, D. A.; KAIANO, J. H.; OLIVEIRA DDE, S.; SILVESTRE, R. V.; GABBAY, Y. B.; GANESH, B.; MASCARENHAS, J. D. Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study. **The Journal of general virology**, v. 95, n.1, p. 117-122, 2014.
- ROSEN, B. I.; FANG, Z. Y.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 316-329, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**, N.Y. 2. ed., 1989.
- SMITS, S. L.; POON, L. L.; VAN LEEUWEN, M.; LAU, P. N.; PERERA, H. K.; PEIRIS, J. S.; SIMON, J. H.; OSTERHAUS, A. D. Genogroup I and II picobirnaviruses in respiratory tracts of pigs. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. 2328-2330, 2011.
- SMITS, S. L.; SCHAPENDONK, C. M.; VAN BEEK, J.; VENNEMA, H.; SCHURCH, A. C.; SCHIPPER, D.; BODEWES, R.; HAAGMANS, B. L.; OSTERHAUS, A. D.; KOOPMANS, M. P. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 7, p. 1218-1222, 2014.
- SUN, G.; ZANG, Q.; GU, Y.; NIU, G.; DING, C.; ZHANG, P. Viral metagenomics analysis of picobirnavirus-positive feces from children with sporadic diarrhea in China. **Archives of virology**, v. 161, n. 4, p. 971-975, 2016.
- TAKIUCHI, E.; MACEDO, R.; KUNZ, A. F.; GALLEGGO, J. C.; DE MELLO, J. L.; OTONEL, R. A.; ALFIERI, A. A. Electrophoretic RNA genomic profiles of Brazilian Picobirnavirus (PBV) strains and molecular characterization of a PBV isolated from diarrheic calf. **Virus research**, v. 211, p. 58-63, 2016.
- WANG, Y.; BANYAI, K.; TU, X.; JIANG, B. Simian genogroup I picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.
- WILBURN, L.; YODMEEKLIN, A.; KOCHJAN, P.; SAIKRUANG, W.; KUMTHIP, K.; KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N. Molecular detection and characterization of picobirnaviruses in piglets with diarrhea in Thailand. **Archives Virology**, 2017.
- WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.
- WOO, P. C.; TENG, J. L.; BAI, R.; WONG, A. Y.; MARTELLI, P.; HUI, S. W.; TSANG, A. K.; LAU, C. C.; AHMED, S. S.; YIP, C. C.; CHOI, G. K.; LI, K. S.; LAM, C. S.; LAU, S. K.; YUEN, K. Y. High Diversity of Genogroup I Picobirnaviruses in Mammals. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1886, 2016.

5 CONCLUSÃO GERAL

1. A infecção pelo *Picobirnavirus* (PBV) em hospedeiros suínos está amplamente disseminada em todas as granjas investigadas neste estudo.
2. O PBV foi detectado em humanos contactantes com os suínos em duas das quatro granjas investigadas, as quais tiveram frequências elevadas de PBV nos suínos.
3. As técnicas empregadas foram eficientes para identificar o vírus, com frequências que variaram de 28,4% e 42,6% em suínos, e 41,6% e 8,3% em humanos, por eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e RT-PCR para o genogrupo I, respectivamente.
4. Suínos de todas as categorias (leitões, fêmeas em lactação, fêmeas gestantes e animais doentes/descarte) foram susceptíveis à infecção pelo PBV, sendo mais acometida a categoria de fêmeas em lactação, com detecção de 44,8% pela EGPA e 43,7% pela RT-PCR.
5. É o primeiro relato de detecção de PBV genogrupo II no Brasil, pela técnica RT-PCR convencional, provenientes de um hospedeiro suíno e um humano contactante.
6. A análise filogenética da sequência de PBV humano do genogrupo II demonstrou alta identidade de nucleotídeos e de aminoácidos com isolados de PBV de suínos e de macaco rhesus.

Este é o primeiro estudo a realizar a investigação do PBV em hospedeiros suínos e humanos contactantes simultaneamente, para avaliar aspectos moleculares do vírus e elucidar tópicos sobre a possibilidade de transmissão interespecie e o potencial zoonótico do PBV.

REFERÊNCIAS

- ADRIAENSSENS, E.; FARKAS, K.; HARRISON, C.; JONES, D.; ALLISON, H. E.; MCCARTHY, A. J. Viromic analysis of wastewater input to a river catchment reveals a diverse assemblage of RNA viruses. **American Society for Microbiology**, v. 3, n. 3, p. e00025-18, 2018.
- ALFIERI, A. A.; PARAZZI, M. E.; TAKIUCHI, E.; MEDICI, K. C.; ALFIERI, A. F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical animal health and production**, v. 38, n. 7-8, p. 521-526, 2006.
- ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; FREITAS, J.; SILVA, C.; FREIRE, R.; BARROS, A.; BARREIROS, M.; MULLER, E. Occurrence of Escherichia coli, rotavirus, picobirnavirus and Cryptosporidium parvum in a post weaning diarrhoea focus in swine. **Ciências Agrárias**, v. 15, n. 1, p. 5-7, 1994.
- ALFIERI, A.; ALFIERI, A.; RESENDE, J.; RESENDE, M. A new bisegmented double stranded RNA virus in avian feces. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 40, p. 437-440, 1988.
- BANYAI, K.; JAKAB, F.; REUTER, G.; BENE, J.; UJ, M.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. **Archives of virology**, v. 148, n. 12, p. 2281-2291, 2003.
- BANYAI, K.; MARTELLA, V.; BOGDAN, A.; FORGACH, P.; JAKAB, F.; MELEG, E.; BIRO, H.; MELEGH, B.; SZUCS, G. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. **The Journal of general virology**, v. 89, n. Pt 2, p. 534-539, 2008.
- BARRETO, M. L.; MILROY, C. A.; STRINA, A.; PRADO, M. S.; LEITE, J. P.; RAMOS, E. A.; RIBEIRO, H.; ALCANTARA-NEVES, N. M.; TEIXEIRA MDA, G.; RODRIGUES, L. C.; RUF, H.; GUERREIRO, H.; TRABULSI, L. R. Community-based monitoring of diarrhea in urban Brazilian children: incidence and associated pathogens. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 3, p. 234-242, 2006.
- BHATTACHARYA, R.; SAHOO, G. C.; NAYAK, M. K.; RAJENDRAN, K.; DUTTA, P.; MITRA, U.; BHATTACHARYA, M. K.; NAIK, T. N.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHNAN, T. Detection of Genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 7, n. 2, p. 229-238, 2006.
- BODEWES, R.; VAN DER GIESSEN, J.; HAAGMANS, B. L.; OSTERHAUS, A. D.; SMITS, S. L. Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. **Journal of virology**, v. 87, n. 13, p. 7758-7764, 2013.

BOOM, R.; SOL, C.; SALIMANS, M.; JANSEN, C.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of clinical microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BUZINARO, M. G.; FREITAS, P. P.; KISIELLIUS, J. J.; UEDA, M.; JEREZ, J. A. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in calf faeces. **Veterinary journal**, v. 166, n. 2, p. 185-187, 2003.

CARRUYO, G. M.; MATEU, G.; MARTINEZ, 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.

CASCIO, A.; BOSCO, M.; VIZZI, E.; GIAMMANCO, A.; FERRARO, D.; ARISTA, S. Identification of Picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. **European Journal of Epidemiology**, v. 12, p. 545–547, 1996.

CHASEY D. Porcine picobirnavirus in UK? **Veterinary Record**, v. 126, n. 18, p. 465, 1990.

CHEN, M.; SUN, H.; LAN, D.; HUA, X.; CUI, L.; YUAN, C.; YANG, Z. Molecular detection of genogroup I and II picobirnaviruses in pigs in China. **Virus Genes**, v. 48, n. 3, p. 553-556, 2014.

CHONG, R.; SHI, M.; GRUEBER, C. E.; HOLMES, E. C.; HOGG, C. J.; BELOV, K.; BARRS, V. R. Fecal viral diversity of captive and wild Tasmanian devils characterized using virion-enriched metagenomics and metatranscriptomics. **Journal of Virology**, v. 93, n. 11, p. 8-19, 2019.

CONCEICAO-NETO, N.; MESQUITA, J. R.; ZELLER, M.; YINDA, C. K.; ALVARES, F.; ROQUE, S.; PETRUCCI-FONSECA, F.; GODINHO, R.; HEYLEN, E.; VAN RANST, M.; MATTHIJNSSENS, J. Reassortment among picobirnaviruses found in wolves. **Archives of virology**, v. 161, n. 10, p. 2859-2862, 2016.

CUNLIFFE, N. A.; GLASS, R. I. Gastrointestinal manifestations of HIV infection. **The Lancet**. p. 348-1037, 1996.

DACHEUX, L.; CERVANTES-GONZALEZ, M.; GUIGON, G.; THIBERGE, J. M.; VANDENBOGAERT, M.; MAUFRAIS, C.; CARO, V.; BOURHY, H. A Preliminary Study of Viral Metagenomics of French Bat Species in Contact with Humans: Identification of New Mammalian Viruses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 87194, 2014.

DELMAS, B., ATTOUI, H., GHOSH, S., MALIK, Y. S., MUNDT, E., VAKHARIA, V. N., AND ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Picobirnaviridae*, **Journal of General Virology**, v. 100, p. 133–134, 2019.

DELWART, E. L. Viral metagenomics. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 115–131, 2007.

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. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 28, p. 1655-1665, 2009.

DURASAMY, R.; AKIANA, J.; DAVOUST, B.; MEDIANNIKOV, O.; MICHELLE, C.; ROBERT, C.; PARRA, H. J.; RAOULT, D.; BIAGINI, P.; DESNUES, C. Detection of novel rna viruses from free-living gorillas, republic of the congo: Genetic diversity of picobirnaviruses. **Virus Genes**, v. 54, p. 256–271, 2018.

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

FREGOLENTE, M. C.; GATTI, M. S. Nomenclature proposal for picobirnavirus. **Archives of virology**, v. 154, n. 12, p. 1953-1954, 2009.

GALLAGHER, C. A., NAVARRO, R., CRUZ, K., AUNG, M. S., NG, A., BAJAK, E., BEIERSCHMITT, A., LAWRENCE, M., DORE, K. M., KETZIS, J., MALIK, Y. S., KOBAYASHI, N., GHOSH, S. Detection of picobirnaviruses in vervet monkeys (*Chlorocebus sabaues*): molecular characterization of complete genomic segment-2. **Virus Research**, v. 230, p. 13-18, 2017.

GALLIMORE, C. I.; GREEN, J.; CASEMORE, D. P.; BROWN, D. W. Detection of a picobirnavirus associated with Cryptosporidium positive stools from humans. **Archives of virology**, v. 140, n. 7, p. 1275-1278, 1995.

GANESH, B.; BANYAI, K.; MARTELLA, V.; JAKAB, F.; MASACHESSI, G.; KOBAYASHI, N. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. **Reviews in medical virology**, v. 22, n. 4, p. 245-256, 2012.

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, p. 52, 2011.

GANESH, B.; MASACHESSI, G.; MLADENOVA, Z. Animal picobirnavirus. **Virus disease**, v. 25, n. 2, p. 223-238, 2014.

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: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 511-516, 2010.

GATTI, M. S.; DE CASTRO, A. F.; FERRAZ, M. M.; FIALHO, A. M.; PEREIRA, H. G. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. **Research in veterinary science**, v. 47, n. 3, p. 397-398, 1989.

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

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; RINALDI, D.; ESPUL, C.; MARTINEZ, N.; ISA, M. B.; DEPETRIS, A. R.; MEDEOT, S. I.; NATES, S. V. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. **AIDS research and human retroviruses**, v. 15, n. 16, p. 1427-1432, 1999.

GIORDANO, M. O.; MARTINEZ, L. C.; RINALDI, D.; GUINARD, S.; NARETTO, E.; CASERO, R.; YACCI, M. R.; DEPETRIS, A. R.; MEDEOT, S. I.; NATES, S. V. Detection of picobirnavirus in HIV-infected patients with diarrhea in Argentina. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association**, v. 18, n. 4, p. 380-383, 1998.

GIORDANO, M. O.; MASACHESSI, G.; MARTINEZ, L. C.; BARRIL, P. A.; FERREYRA, L. J.; ISA, M. B.; NATES, S. V. Two instances of large genome profile picobirnavirus occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977-2002). **The Journal of infection**, v. 56, n. 5, p. 371-375, 2008.

GONZALEZ, G. G.; PUJOL, F. H.; LIPRANDI, F.; DEIBIS, L.; LUDERT, J. E. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. **Journal of Medical Virology**, v. 55, p. 288-292, 1998.

GROHMANN, G. S.; GLASS, R. I.; PEREIRA, H. G.; MONROE, S. S.; HIGHTOWER, A. W.; WEBER, R.; BRYAN, R. T. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. Enteric Opportunistic Infections Working Group. **The New England journal of medicine**, v. 329, n. 1, p. 14-20, 1993.

HAGA, I. R.; MARTINS, S. S.; HOSOMI, S. T.; VICENTINI, F.; TANAKA, H.; GATTI, M. S. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (Picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **Veterinary journal**, v. 158, n. 3, p. 234-236, 1999.

HAMZA, I. A.; JURZIK, L.; UBERLA, K.; WILHELM, M. Evolution 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.

HERRING, A.; INGLIS, N.; OJEH, C.; SNODGRASS, D. A.; MENZIES, J. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. **Journal of clinical microbiology**, v. 16, n. 3, p. 473-477, 1982.

KNOX, M. A.; GEDYE, K. R.; HAYMAN, D. T. S. The challenges of analysing highly diverse Picobirnavirus sequence data. **Viruses**, v.10, p. 685-696, 2018.

- KOHNO, H.; AKIHARA, S.; NISHIO, O.; USHIJIMA, H. Development of a simple and rapid latex test for rotavirus in stool samples. **Pediatrics international: official journal of the Japan Pediatric Society**, v. 42, n. 4, p. 395-400, 2000.
- KRISHNAMURTHY, S. R., WANGA, D. Extensive conservation of prokaryotic ribosomal binding sites in known and novel picobirnaviruses. **Virology**, v. 516, p. 108–114, 2018.
- KUHAR, U.; JAMNIKAR-CIGLENEKI, U. High detection rate and high genetic diversity of genogroup I Picobirnaviruses from roe deer. *Infection, Genetic and Evolution*, v. 73, p. 210-213, 2019.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.
- KUNZ, A. F.; POSSATTI, F.; FREITAS, J. A.; ALFIERI, A. A.; TAKIUCHI, E. High detection rate and genetic diversity of picobirnavirus in a sheep flock in Brazil. **Virus research**, v. 255, p. 10-13, 2018.
- KYLLA, H.; DUTTA, T. K.; ROYCHOUDHURY, P.; MALIK, Y. S.; MANDAKINI, R.; SUBUDHI, P. K. Prevalence and molecular characterization of porcine Picobirnavirus in piglets of North East Region of India. **Tropical animal health and production**, v. 49, n. 2, p. 417-422, 2017.
- LEEUVEN, M. V.; 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. 10, p. 1787–94, 2010.
- LEGOFF, J.; RESCHE-RIGON, M.; BOUQUET, J.; ROBIN, M.; NACCACHE, S.; MERCIER-DELARUE, S.; FEDERMAN, S.; SAMAYOA, E.; ROUSSEAU, C.; PIRON, P.; KAPEL, N.; SIMON, F.; SOCIÉ, G.; CHIU, C. Y. The eukaryotic gut virome in hematopoietic stem cell transplantation: new clues in enteric graft-versus-host disease. **Nature medicine**, v. 23, p. 1080-1085, 2017.
- LI, L.; GIANNITTI, F.; LOW, J.; KEYES, C.; ULLMANN, L. S.; DENG, X.; ALEMAN, M.; PESAVENTO, P. A.; PUSTERLA, N.; DELWART, E. Exploring the virome of diseased horses. **The Journal of general virology**, v. 96, n. 9, p. 2721-2733, 2015.
- LI, L.; SHAN, T.; WANG, C.; CÔTÉ, C.; KOLMAN, J.; ONIONS, D.; GULLAND, F.; DELWART, E. The Fecal Viral Flora of California Sea Lions. **Journal of Virology**, v. 85, n. 19, p. 9909-9917, 2011.
- LIMA, D. A.; CIBULSKI, S. P.; TOCHETTO, C.; VARELA, A. P. M.; FINKLER, F.; TEIXEIRA, T. F.; LOIKO, M. R.; CERVA, C.; JUNQUEIRA, D. M.; MAYER, F. Q.; ROEHE, P. M. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. **Virus research**, v. 261, p. 9-20, 2019.

- LUDERT, J. E.; HIDALGO, M.; GIL, F.; LIPRANDI, F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. **Archives of virology**, v. 117, n. 1-2, p. 97-107, 1991.
- LUO, X.; LU, S.; JIN, D.; YANG, J.; WU, S.; XU, J. Marmota himalayana in the Qinghai-Tibetan plateau as a special host for bi-segmented and unsegmented picobirnaviruses. **Emerging microbes e infections**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2018.
- MALIK, Y. S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; DHAMA, K.; SHABBIR, M. Z.; GANESH, B.; KOBAYASHI, N.; BANYAI, K. Epidemiology, phylogeny, and evolution of emerging enteric Picobirnaviruses of animal origin and their relationship to human strains. **BioMed research international**, v. 2014, p. 1-13, 2014.
- MALIK, Y. S.; SIRCAR, S.; DHAMA, K.; SINGH, R.; GHOSH, S.; BANYAI, K.; VLASOVA, A. N.; NADIA, T.; SINGH, R. K. Molecular epidemiology and characterization of picobirnaviruses in small ruminant populations in india. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 63, p. 39–42, 2018.
- MALIK, Y. S.; SIRCAR, S.; SAURABH, S.; KATTOOR, J. J.; SINGH, R.; GANESH, B.; GHOSH, S.; DHAMA, K.; SINGH, R. K. Epidemiologic status of Picobirnavirus in India, A less explored viral disease. **The Open Virology Journal**, v. 12, p. 99-109, 2018.
- MARTÍNEZ, L. C.; GIORDANO, M. O.; ISA, B. M.; ALVARADO, L. F.; PAVÁN, J. V.; RINALDI, D.; NATES, S. V. Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobirnavirus. **Intervirolgy**, v. 46, n. 4, p. 207-213, 2003.
- MARTINEZ, 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: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 10, n. 7, p. 984-988, 2010.
- MASACHESSI, G.; GANESH, B.; MARTINEZ, L. C.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, M. B.; PAVAN, G. V.; MATEOS, C. A.; NATES, S. V. Maintenance of picobirnavirus (PBV) infection in an adult orangutan (*Pongo pygmaeus*) and genetic diversity of excreted viral strains during a three-year period. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 29, p. 196-202, 2015.
- MASACHESSI, G.; MARTINEZ, L. C.; GANESH, B.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, M. B.; IBARS, A.; PAVAN, J. V.; NATES, S. V. Establishment and maintenance of persistent infection by picobirnavirus in greater rhea (*Rhea Americana*). **Archives of virology**, v. 157, n. 11, p. 2075-2082, 2012.
- MONDAL, A.; MAJEE, S. Novel bisegmented virus (picobirnavirus) of animals, birds and humans. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, n. 4, p. 154-158, 2014.

- NATES, S. V.; GATTI, M. S. V.; LUDERT, J. E. The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential. **Future Virology**, v. 6, n. 2, p. 223-235, 2011.
- NAVARRO, J. O.; CANDIDO, M.; ALMEIDA-QUEIROZ, S. R.; BUZINARO, M. G.; LIVONESI, M. C.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. L. M. Genetic diversity of bovine *Picobirnavirus*, Brazil. **Virus genes**, v. 54, p. 724-728, 2018.
- NAVARRO, R.; YIBIN, C.; NAIR, R.; PEDA, A.; AUNG, M. S.; KETZIS, J.; MALIK, Y. S.; KOBAYASHI, N.; GHOSH, S. Molecular characterization of complete genomic segment-2 of picobirnavirus strains detected in a cat and a dog. **Infection, genetics and evolution**, v. 54, p. 200-204, 2017.
- PARRISH, C. R.; HOLMES, E. C.; MORENS, D. M.; PARK, E. C.; BURKE, D. S.; CALISHER, C. H.; LAUGHLIN, C. A.; SAIF, L. J.; DASZAK, P. Cross-species virus transmission and the emergence of new epidemic diseases. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 72, n. 3, p. 457-70, 2008.
- PEREIRA, H. G.; FIALHO, A. M.; FLEWETT, T. H.; TEIXEIRA, J. M.; ANDRADE, Z. P. Novel viruses in human faeces. **Lancet**, v. 2, n. 8602, p. 103-104, 1988a.
- PEREIRA, H. G.; FLEWETT, T. H.; CANDEIAS, J. A.; BARTH, O. M. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. **The Journal of general virology**, v. 69, p. 2749-2754, 1988b.
- PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASY, C.; URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 1050-1057, 1996.
- RIBEIRO SILVA, R.; BEZERRA, D. A.; KAIANO, J. H.; OLIVEIRA DDE, S.; SILVESTRE, R. V.; GABBAY, Y. B.; GANESH, B.; MASCARENHAS, J. D. Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study. **The Journal of general virology**, v. 95, n. 1, p. 117-122, 2014.
- ROSEN, B. I.; FANG, Z. Y.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. **Virology**, v. 277, n. 2, p. 316-329, 2000.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, **Cold Spring Harbor**, N.Y. 2. ed., 1989.
- SMITS, S. L.; POON, L. L.; VAN LEEUWEN, M.; LAU, P. N.; PERERA, H. K.; PEIRIS, J. S.; SIMON, J. H.; OSTERHAUS, A. D. Genogroup I and II picobirnaviruses in respiratory tracts of pigs. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. 2328-2330, 2011.
- SMITS, S. L.; RAJ, V. S.; ODUBER, M. D.; SCHAPENDONK, C. M.; BODEWES, R.; PROVACIA, L.; STITTELAAR, K. J.; OSTERHAUS, A. D.; HAAGMANS, B. L.

Metagenomic analysis of the ferret fecal viral flora. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71595, 2013.

SMITS, S. L.; SCHAPENDONK, C. M.; VAN BEEK, J.; VENNEMA, H.; SCHURCH, A. C.; SCHIPPER, D.; BODEWES, R.; HAAGMANS, B. L.; OSTERHAUS, A. D.; KOOPMANS, M. P. New viruses in idiopathic human diarrhea cases, the Netherlands. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 7, p. 1218-1222, 2014.

SMITS, S. L.; VAN LEEUWEN, M.; SCHAPENDONK, C. M.; SCHURCH, A. C.; BODEWES, R.; HAAGMANS, B. L.; OSTERHAUS, A. D. Picobirnaviruses in the human respiratory tract. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 9, p. 1539-1540, 2012.

SUN, G.; ZANG, Q.; GU, Y.; NIU, G.; DING, C.; ZHANG, P. Viral metagenomics analysis of picobirnavirus-positive feces from children with sporadic diarrhea in China. **Archives of virology**, v. 161, n. 4, p. 971-975, 2016.

TAKIUCHI, E.; MACEDO, R.; KUNZ, A. F.; GALLEGOS, J. C.; DE MELLO, J. L.; OTONEL, R. A.; ALFIERI, A. A. Electrophoretic RNA genomic profiles of Brazilian Picobirnavirus (PBV) strains and molecular characterization of a PBV isolated from diarrheic calf. **Virus research**, v. 211, p. 58-63, 2016.

TAMEHIRO, C. Y.; ALFIERI, A. F.; MÉDICI, C.; ALFIERI, A. A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 344-348, 2003.

VALLE, M. C.; MARTINEZ, L. C.; FERREYRA, L. J.; GIORDANO, M. O.; ISA, M. B.; PAVAN, J. V.; DE BOCCARDO, G.; MASSARI, P. U.; NATES, S. V. Viral agents related to diarrheic syndrome in kidney transplanted patients. **Medicina (B Aires)**, v. 61, n. 2, p. 179-182, 2001.

VIRAL ZONE. **Picobirnavirus**. Disponível em: < <https://viralzone.expasy.org/602>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

WAKUDA, M.; PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. **Journal of virological methods**, v. 126, n. 1-2, p. 165-169, 2005.

WANG, Y.; BANYAI, K.; TU, X.; JIANG, B. Simian genogroup I picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

WILBURN, L.; YODMEEKLIN, A.; KOCHJAN, P.; SAIKRUANG, W.; KUMTHIP, K.; KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N. Molecular detection and characterization of picobirnaviruses in piglets with diarrhea in Thailand. **Archives Virology**, 2017.

WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; TSANG, A. K. L.; JOSEPH, M.; WONG, E. Y. M. Metagenomic analysis of viromes of dromedary camel fecal samples reveals large number and high diversity of circoviruses and picobirnaviruses. **Virology**, v. 473, p. 117–125, 2014.

WOO, P. C.; LAU, S. K.; BAI, R.; TENG, J. L.; LEE, P.; MARTELLI, P.; HUI, S. W.; YUEN, K. Y. Complete genome sequence of a novel picobirnavirus, otarine picobirnavirus, discovered in California sea lions. **Journal of virology**, v. 86, n. 11, p. 6377-6378, 2012.

WOO, P. C.; TENG, J. L.; BAI, R.; WONG, A. Y.; MARTELLI, P.; HUI, S. W.; TSANG, A. K.; LAU, C. C.; AHMED, S. S.; YIP, C. C.; CHOI, G. K.; LI, K. S.; LAM, C. S.; LAU, S. K.; YUEN, K. Y. High Diversity of Genogroup I Picobirnaviruses in Mammals. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1886, 2016.

ZHANG, T.; BREITBART, M.; LEE, W. H.; RUN, J. Q.; WEI, C. L.; SOH, S. W.; HIBBERD, M. L.; LIU, E. T.; ROHWER, F.; RUAN, Y. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. **PLoS Biology**, v. 4, n. 1, p. 108-118, 2006.

ZHANG, S.; ZAI, R.; FENG, R.; ZHANG, H.; LOI, L. Detection and evolutionary analysis of picobirnaviruses in treated wastewater. **Micorbial biotechnology**, v. 8, p. 474 – 482, 2014.

6 APÊNDICES

Apêndice A: Relação das amostras de suínos de granjas comerciais, avaliadas no período do estudo e os resultados obtidos.

Propriedade	Localidade	N	ID Amostra	Categoria animal	EGPA	RT-PCR GI	RT-PCR GII	Sequenciamento	Data da coleta
01.18	Palotina	1	Sui 01	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	2	Sui 02	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	3	Sui 03	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	4	Sui 04	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	5	Sui 05	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	6	Sui 06	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	7	Sui 07a	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	8	Sui 07b	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	9	Sui 08a	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	10	Sui 08b	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	11	Sui 09	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	12	Sui 10	Leitão	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	13	Sui 11	Leitão	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	14	Sui 12a	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	15	Sui 12b	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	16	Sui 13a	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	17	Sui 13b	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	18	Sui 14	Leitão	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	19	Sui 15	Leitão	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	20	Sui 16	Leitão	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	21	Sui 17	Leitão	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	22	Sui 18	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	23	Sui 19a	Leitão	-	-	NR	NR	23/02/2018

01.18	Palotina	24	Sui 19b	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	25	Sui 20a	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	26	Sui 20b	Leitão	-	-	+	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	27	Sui 21	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	28	Sui 21	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	29	Sui 22	Leitão	-	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	30	Sui 23	Leitão	-	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	31	Sui 24	Leitão	-	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	32	Sui 25	Leitão	-	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	33	Sui 27	Leitão	-	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	34	Sui 27a	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	35	Sui 28	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	36	Sui 29	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	37	Sui 30	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	38	Sui 32	Leitão	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	39	Sui 34	Doente/descarte	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	40	Sui 35	Doente/descarte	-	-	+	NR	-	23/02/2018
01.18	Palotina	41	Sui 36a	Doente/descarte	-	-	+	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	42	Sui 36b	Doente/descarte	-	-	-	NR	NR	23/02/2018
01.18	Palotina	43	Sui 37	Doente/descarte	-	-	+	NR	NR	23/02/2018
02.18	ERO	44	Sui 82	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	45	Sui 84	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	46	Sui 85	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	47	Sui 86	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	48	Sui 87	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	49	Sui 88	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	50	Sui 89	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018

02.18	ERO	51	Sui 90	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	52	Sui 91	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	53	Sui 92	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	54	Sui 93	Fêmea gestante	-	-	+	NR	-	25/10/2018
02.18	ERO	55	Sui 94	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	56	Sui 95	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	57	Sui 96	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	58	Sui 97	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	59	Sui 98	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	60	Sui 99	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	61	Sui 100	Fêmea gestante	-	-	+	NR	-	25/10/2018
02.18	ERO	62	Sui 101	Fêmea gestante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	63	Sui 102	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	64	Sui 103	Fêmea gestante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	65	Sui 104	Fêmea gestante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	66	Sui 105	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	67	Sui 106	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	68	Sui 107	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	69	Sui 108	Fêmea gestante	-	-	+	NR	-	25/10/2018
02.18	ERO	70	Sui 109	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	71	Sui 111	Fêmea gestante	+	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	72	Sui 112	Fêmea gestante	-	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	73	Sui 113	Fêmea gestante	+	-	+	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	74	Sui 114	Fêmea gestante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	75	Sui 115	Leitão	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	76	Sui 116	Leitão	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	77	Sui 117	Leitão	-	-	+	NR	NR	25/10/2018

02.18	ERO	78	Sui 118	Leitão	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	79	Sui 119	Leitão	-	+	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	80	Sui 120	Leitão	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	81	Sui 121	Leitão	-	+	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	82	Sui 122	Leitão	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	83	Sui 123	Leitão	+	+	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	84	Sui 124	Leitão	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	85	Sui 125	Leitão	-	+	-	NR	NR	25/10/2018
02.18	ERO	86	Sui 126	Leitão	+	+	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	87	Sui 199	Leitão	+	+	+	-	-	25/10/2018
03.18	MCR	88	Sui 200	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	89	Sui 201	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	90	Sui 202	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	91	Sui 203	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	92	Sui 204	Fêmea lactante	+	+	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	93	Sui 205	Fêmea lactante	+	+	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	94	Sui 206	Fêmea lactante	+	+	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	95	Sui 207	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	96	Sui 208	Fêmea lactante	+	+	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	97	Sui 209	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	98	Sui 210	Fêmea lactante	-	+	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	99	Sui 211	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	100	Sui 212	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	101	Sui 213	Fêmea lactante	+	+	-	-	-	25/10/2018
03.18	MCR	102	Sui 214	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
03.18	MCR	103	Sui 215	Fêmea lactante	+	+	-	NR	NR	25/10/2018

03.18	MCR	104	Sui 216	Fêmea lactante	-	+	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	105	Sui 218	Fêmea lactante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	106	Sui 219	Fêmea lactante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	107	Sui 220	Fêmea gestante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	108	Sui 221	Fêmea gestante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	109	Sui 222	Fêmea gestante	+	+	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	110	Sui 223	Fêmea gestante	-	+	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	111	Sui 224	Fêmea gestante	-	+	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	112	Sui 225	Fêmea gestante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	113	Sui 226	Fêmea gestante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	114	Sui 227	Fêmea gestante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	115	Sui 228	Doente/descarte	-	+	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	116	Sui 229	Fêmea gestante	+	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	117	Sui 230	Doente/descarte	-	+	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	118	Sui 231	Fêmea gestante	+	+	-	-	25/10/2018
03.18	MCR	119	Sui 232	Fêmea gestante	-	+	-	-	25/10/2018
03.18	MCR	120	Sui 233	Fêmea gestante	-	+	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	121	Sui 234	Doente/descarte	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	122	Sui 235	Fêmea lactante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	123	Sui 236	Fêmea lactante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	124	Sui 237	Doente/descarte	+	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	125	Sui 238	Fêmea lactante	+	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	126	Sui 239	Leitão	+	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	127	Sui 240	Leitão	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	128	Sui 241	Fêmea lactante	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	129	Sui 242	Fêmea lactante	+	-	-	NR	25/10/2018

03.18	MCR	130	Sui 243	Fêmea lactante	-	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	131	Sui 244	Fêmea lactante	-	+	-	-	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	132	Sui 245	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	133	Sui 246	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	134	Sui 247	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	135	Sui 248	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	136	Sui 249	Leitão	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	137	Sui 250	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	138	Sui 251	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	139	Sui 252	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	140	Sui 253	Leitão	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	141	Sui 254	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	142	Sui 255	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	143	Sui 256	Fêmea lactante	+	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	144	Sui 257	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	145	Sui 258	Fêmea lactante	-	+	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	146	Sui 259	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	147	Sui 260	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	148	Sui 261	Fêmea lactante	+	+	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	149	Sui 262	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	150	Sui 263	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	151	Sui 264	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	152	Sui 265	Fêmea lactante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	153	Sui 266	Fêmea gestante	-	-	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	154	Sui 289	Fêmea gestante	-	+	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	155	Sui 290	Leitão	-	+	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	156	Sui 291	Fêmea lactante	-	+	-	NR	NR	25/10/2018

05.18	Mercedes	157	Sui 292	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	158	Sui 293	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	159	Sui 294	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	160	Sui 295	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	161	Sui 296	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	162	Sui 297	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	163	Sui 298	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	164	Sui 299	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	165	Sui 300	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	166	Sui 301	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	167	Sui 302	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	168	Sui 303	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	169	Sui 304	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	170	Sui 305	Fêmea lactante	+	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	171	Sui 306	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	172	Sui 307	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	173	Sui 308	Fêmea lactante	+	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	174	Sui 309	Fêmea lactante	+	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	175	Sui 310	Fêmea lactante	+	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	176	Sui 311	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	177	Sui 312	Fêmea lactante	+	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	178	Sui 313	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	179	Sui 314	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	180	Sui 315	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	181	Sui 316	Fêmea lactante	+	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	182	Sui 317	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	183	Sui 318	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018

05.18	Mercedes	184	Sui 319	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	185	Sui 320	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	186	Sui 322	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	187	Sui 323	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	188	Sui 324	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	189	Sui 325	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	190	Sui 326	Fêmea lactante	+	+	-	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	191	Sui 327	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	192	Sui 328	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	193	Sui 329	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	194	Sui 330	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	195	Sui 331	Fêmea lactante	-	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	196	Sui 332	Fêmea lactante	+	+	NR	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	197	Sui 333	Fêmea lactante	-	-	NR	NR	25/10/2018

NR – Não realizado

ERO – Entre Rios do Oeste

MCR – Marechal Cândido Rondon

Apêndice B: Relação das amostras humanas, avaliadas no período do estudo e os resultados obtidos

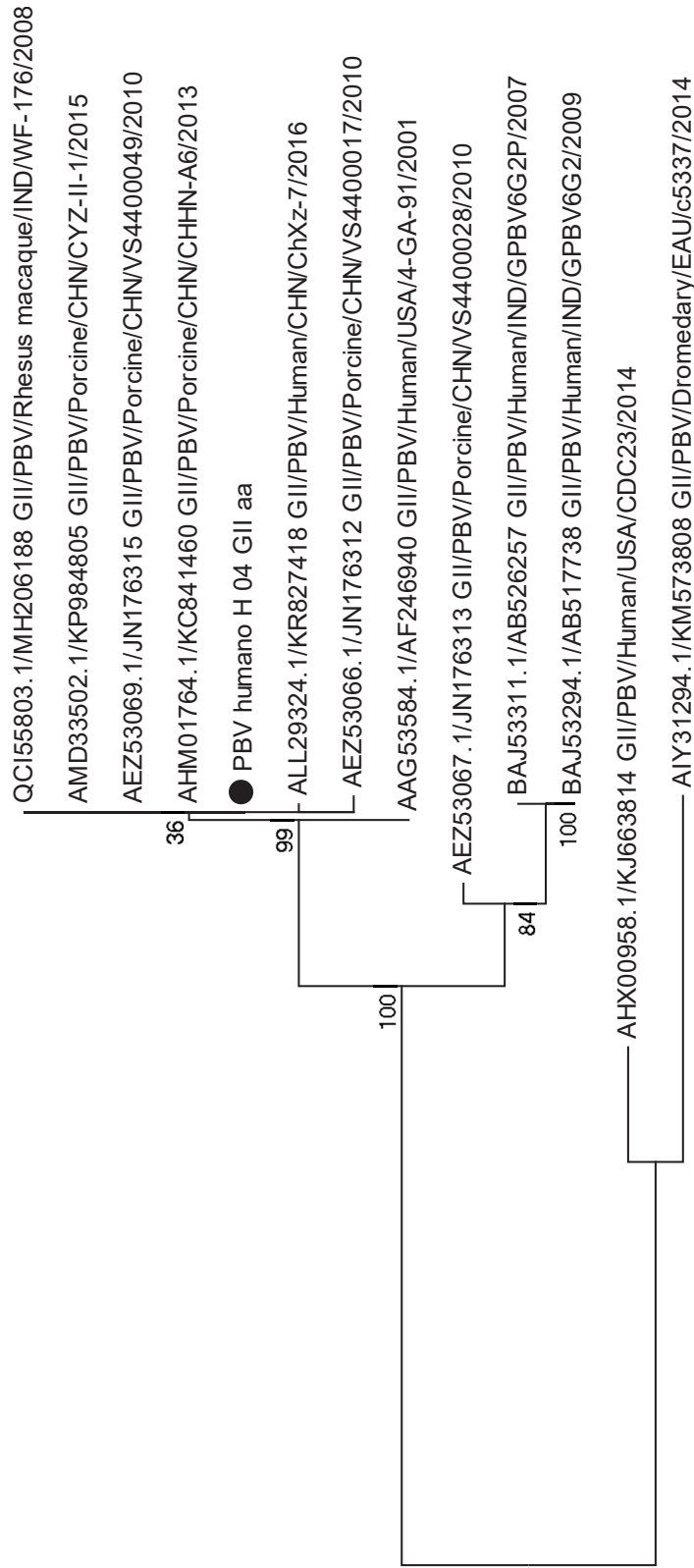
Propriedade	Localidade	N	ID Amostra	EGPA	RT-PCR GI	RT-PCR GII	Sequenciamento	Data da coleta
02.18	ERO	1	H01	-	-	-	NR	25/10/2018
02.18	ERO	2	H02	-	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	3	H03	+	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	4	H04	+	-	+	+	25/10/2018
03.18	MCR	5	H05	+	-	-	NR	25/10/2018
03.18	MCR	6	H09	-	-	-	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	7	H08	-	-	-	NR	25/10/2018
04.18	Mercedes	8	H12	-	-	-	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	9	H06	+	+	-	-	25/10/2018
05.18	Mercedes	10	H07	-	-	-	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	11	H10	+	-	-	NR	25/10/2018
05.18	Mercedes	12	H11	-	-	-	NR	25/10/2018

NR – Não realizado

ERO – Entre Rios do Oeste

MCR – Marechal Cândido Rondon

Apêndice E: Análise filogenética baseada na sequência parcial de aminoácidos deduzidos do gene RdRp de isolados de PBV-GII. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Maximum Likelihood*, modelo evolutivo *Le Gascuel* (LG), com distribuição *Gamma* (G), e 1.000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* são indicados próximos aos nós. Os isolados incluídos na análise estão identificados com o número de acesso *GenBank*. A sequência obtida neste estudo está indicada pelo símbolo ●.



Apêndice F: Matriz de identidade nucleotídica da região consensual da sequência de PBV gerada neste estudo, frente as demais representativas do gene RdRp do PBV-GI, PBV-GII e PBV-GIII disponíveis em bases públicas de dados.

H_04	KC841460	JN176315	AF246940	MH206188	KR827418	AB526257	KP984805	KM573808	AB517738	KJ663814	JN176313	JN176312	KR827414	KJ663816	KX374477	KY214432	MK378852	KR827417	KJ206569
ID	0,973	0,982	0,979	0,979	0,982	0,677	0,97	0,428	0,677	0,437	0,695	0,949	0,286	0,288	0,286	0,291	0,291	0,33	0,376
0,973	ID	0,979	0,97	0,976	0,973	0,68	0,997	0,434	0,68	0,44	0,695	0,964	0,297	0,3	0,288	0,294	0,294	0,344	0,385
0,982	0,979	ID	0,979	0,985	0,988	0,674	0,982	0,434	0,674	0,437	0,692	0,955	0,294	0,297	0,291	0,291	0,297	0,339	0,376
0,979	0,97	0,979	ID	0,97	0,973	0,68	0,973	0,437	0,68	0,446	0,698	0,952	0,283	0,286	0,291	0,294	0,297	0,336	0,376
0,979	0,976	0,985	0,97	ID	0,979	0,677	0,973	0,434	0,677	0,443	0,695	0,952	0,291	0,294	0,286	0,286	0,291	0,339	0,376
0,982	0,973	0,988	0,973	0,979	ID	0,668	0,97	0,434	0,668	0,437	0,686	0,949	0,286	0,288	0,291	0,291	0,297	0,333	0,37
0,677	0,68	0,674	0,68	0,677	0,668	ID	0,683	0,429	1	0,474	0,794	0,671	0,351	0,357	0,291	0,297	0,3	0,385	0,397
0,97	0,997	0,982	0,973	0,973	0,97	0,683	ID	0,431	0,683	0,443	0,698	0,961	0,297	0,3	0,288	0,294	0,294	0,347	0,385
0,428	0,434	0,434	0,437	0,434	0,434	0,429	0,431	ID	0,429	0,588	0,42	0,437	0,334	0,337	0,372	0,343	0,381	0,402	0,432
0,677	0,68	0,674	0,68	0,677	0,668	1	0,683	0,429	ID	0,474	0,794	0,671	0,351	0,357	0,291	0,297	0,3	0,385	0,397
0,437	0,44	0,437	0,446	0,443	0,437	0,474	0,443	0,588	0,474	ID	0,45	0,431	0,334	0,34	0,331	0,369	0,328	0,36	0,384
0,695	0,695	0,692	0,698	0,695	0,686	0,794	0,698	0,42	0,794	0,45	ID	0,692	0,317	0,325	0,271	0,288	0,282	0,371	0,411
0,949	0,964	0,955	0,952	0,952	0,949	0,671	0,961	0,437	0,671	0,431	0,692	ID	0,288	0,291	0,291	0,294	0,297	0,347	0,385
0,286	0,297	0,294	0,283	0,291	0,286	0,351	0,297	0,334	0,351	0,334	0,317	0,288	ID	0,984	0,594	0,642	0,612	0,389	0,374
0,288	0,3	0,297	0,286	0,294	0,288	0,357	0,3	0,337	0,357	0,34	0,325	0,291	0,984	ID	0,6	0,648	0,618	0,382	0,373
0,286	0,288	0,291	0,286	0,286	0,291	0,291	0,288	0,372	0,291	0,331	0,271	0,291	0,594	0,6	ID	0,66	0,924	0,415	0,43
0,291	0,294	0,291	0,294	0,286	0,291	0,297	0,294	0,343	0,297	0,369	0,288	0,294	0,642	0,648	0,66	ID	0,663	0,373	0,397
0,291	0,294	0,297	0,297	0,291	0,297	0,3	0,294	0,381	0,3	0,328	0,282	0,297	0,612	0,618	0,924	0,663	ID	0,388	0,43
0,33	0,344	0,339	0,336	0,333	0,333	0,385	0,347	0,402	0,385	0,36	0,371	0,347	0,389	0,382	0,415	0,373	0,388	ID	0,513
0,376	0,385	0,376	0,376	0,37	0,37	0,397	0,385	0,432	0,397	0,384	0,411	0,385	0,374	0,373	0,43	0,397	0,43	0,513	ID

Legenda:

H_04: H_04_GII/PBV/Human/BRA/H_04/2018	KP984805: KP984805_GII/PBV/Porcine/CHN/CVZ-II-1/2015	KJ663816: KJ663816_GI/PBV/Human/USA/CDC16/2014
KC841460: KC841460_GII/PBV/Porcine/CHN/CHHN-A6/2013	KM573808: KM573808_GII/PBV/Dromedary/EAU/c5337/2014	KX374477: KX374477_GI/PBV/Porcine/IND/ASM-Por183/2013
JN176315: JN176315_GII/PBV/Porcine/CHN/VS4400049/2010	AB517738: AB517738_GII/PBV/Human/IND/GPBV6G2/2009	KY214432: KY214432_GI/PBV/Porcine/BEL/15V010/2017
AF246940: AF246940_GII/PBV/Human/USA/4-GA-91/2001	KJ663814: KJ663814_GII/PBV/Human/USA/CDC23/2014	MK378852: MK378852_GI/PBV/Porcine/CHN/JL01_C2/2019
MH206188: MH206188_GII/PBV/Rhesus_macaque/IND/WF-176/2008	JN176313: JN176313_GII/PBV/Porcine/CHN/VS4400028/2010	KR827417: KR827417_GII/PBV/Human/CHN/ChXz-6/2016
KR827418: KR827418_GII/PBV/Human/CHN/ChXz-7/2016	JN176312: JN176312_GII/PBV/Porcine/CHN/VS4400017/2010	KI206569: KI206569_GIII/PBV/Human/CHN/VS6600008/2014
AB526257: AB526257_GII/PBV/Human/IND/GPBV6G2P/2007	KR827414: KR827414_GII/PBV/Human/CHN/ChXz-3/2016	

Apêndice G: Matriz de identidade de sequências parciais de aminoácidos deduzidos do gene RdRp de isolados de PBV-GII.

Acesso	H_04	AAG53584	AHM01764	AEZ53069	QCI55803	AMD33502	ALL29324	AEZ53066	BAJ53311	AIY31294	BAJ53294	AHX00958	AEZ53067
H_04	ID	0,991	1	1	1	1	0,991	0,982	0,705	0,276	0,705	0,321	0,741
AAG53584	0,991	ID	0,991	0,991	0,991	0,991	0,982	0,973	0,714	0,276	0,714	0,321	0,75
AHM01764	1	0,991	ID	1	1	1	0,991	0,982	0,705	0,276	0,705	0,321	0,741
AEZ53069	1	0,991	1	ID	1	1	0,991	0,982	0,705	0,276	0,705	0,321	0,741
QCI55803	1	0,991	1	1	ID	1	0,991	0,982	0,705	0,276	0,705	0,321	0,741
AMD33502	1	0,991	1	1	1	ID	0,991	0,982	0,705	0,276	0,705	0,321	0,741
ALL29324	0,991	0,982	0,991	0,991	0,991	0,991	ID	0,973	0,696	0,276	0,696	0,321	0,732
AEZ53066	0,982	0,973	0,982	0,982	0,982	0,982	0,973	ID	0,705	0,276	0,705	0,321	0,741
BAJ53311	0,705	0,714	0,705	0,705	0,705	0,705	0,696	0,705	ID	0,27	1	0,342	0,873
AIY31294	0,276	0,276	0,276	0,276	0,276	0,276	0,276	0,276	0,27	ID	0,27	0,635	0,279
BAJ53294	0,705	0,714	0,705	0,705	0,705	0,705	0,696	0,705	1	0,27	ID	0,342	0,873
AHX00958	0,321	0,321	0,321	0,321	0,321	0,321	0,321	0,321	0,342	0,635	0,342	ID	0,333
AEZ53067	0,741	0,75	0,741	0,741	0,741	0,741	0,732	0,741	0,873	0,279	0,873	0,333	ID

Legenda:

H_04: H_04_GII/PBV/Human/BRA/H_04/2018	AEZ53066: JN176312_GII/PBV/Porcine/CHN/VS4400017/2010
AAG53584: AF246940_GII/PBV/Human/USA/4-GA-91/2001	BAJ53311: AB526257_GII/PBV/Human/IND/GPBV6G2P/2007
AHM01764: KC841460_GII/PBV/Porcine/CHN/CHHN-A6/2013	AIY31294: KM573808_GII/PBV/Dromedary/EAU/c5337/2014
AEZ53069: JN176315_GII/PBV/Porcine/CHN/VS4400049/2010	BAJ53294: AB517738_GII/PBV/Human/IND/GPBV6G2/2009
QCI55803: MH206188_GII/PBV/Rhesus_macaque/IND/WF-176/2008	AHX00958: KJ663814_GII/PBV/Human/USA/CDC23/2014
AMD33502: KP984805_GII/PBV/Porcine/CHN/CYZ-II-1/2015	AEZ53067: JN176313_GII/PBV/Porcine/CHN/VS4400028/2010
ALL29324: KR827418_GII/PBV/Human/CHN/ChXz-7/2016	

Apêndice H: Soluções e tampões utilizados para detecção do *Picobirnavirus* pelas técnicas eletroforese em gel de poliacrilamida e RT-PCR.

- **Hidratação da sílica**

- 60g de sílica
- Adicionar 500ml de água MilliQ autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24h
- Por sucção, desprezar 430mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5h para sedimentar
- Desprezar 440mL do sobrenadante
- Adicionar 600uL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (pH=2,0)
- Aliquotar e autoclavar

- **Fenol/clorofórmio-álcool isoamílico**

- 25 mL fenol saturado
- 24 mL clorofórmio
- 1 mL álcool isoamílico

Obs: Após a mistura deixar a solução em repouso (solução bifásica)

- **Solução L6**

- 120 g de tiocianato de guanidina
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 g de Triton x 100

- **Solução L2**

- 120 g de tiocianato de guanidina
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)**

- 0,2 mL de azul de bromofenol 1%
- 6,0 mL de SDS 10%
- 1 mL de 2-mercaptoetanol
- 2,5 mL de TRIS-HCl 0,5 M

- **Tampão de corrida para EGPA**
 - 30 g de TRIS (0,24 M)
 - 14,4 g de ácido aminoacético (glicina) (NH₂CH₂COOH) (0,19 M)
 - Água bidestilada q.s.p. 1 litro
- **SDS 10%**
 - 5 g dodecilsulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS
 - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 mL
- **Lower TRIS pH 8,8 para confecção do gel inferior da EGPA**
 - 36,34 g de TRIS (1,5 M)
 - Água bidestilada q.s.p. 200 mL
- **Upper TRIS pH 6,8 para confecção do gel superior da PAGE**
 - 12,12 g de TRIS (0,5 M)
 - Água bidestilada q.s.p. 200 mL
- **Solução Acrilamida / Bisacrilamida**
 - 1,3 g de bisacrilamida
 - 50 g de acrilamida
 - Água bidestilada q.s.p. 100 mL
- **Solução fixadora para EGPA**
 - 30 mL de álcool etílico absoluto
 - 1,5 mL de ácido acético
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução de nitrato de prata para EGPA**
 - 0,55 g de nitrato de prata
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução reveladora para EGPA**
 - 9 g de hidróxido de sódio
 - 2,5 mL de formaldeído
 - 0,06 g de borohidreto de sódio
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
- **Solução stop da coloração para EGPA**
 - 15 mL de ácido acético P.A.
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL

- **Solução conservadora para EGPA**
 - 15 mL de álcool etílico P.A.
 - Água bidestilada q.s.p. 300 mL
 - **Gel inferior (7,5%) ou gel de resolução da EGPA**
 - 5 mL de Lower TRIS
 - 3 mL de acrilamida/bisacrilamida
 - 50 µL de TEMED
 - 0,56 mL de persulfato de amônio 2%
 - 11,44 mL de água bidestilada
 - **Gel superior (3,5%) ou gel de empilhamento da EGPA**
 - 2,5 mL de Upper TRIS
 - 1 mL de acrilamida/bisacrilamida
 - 100 µL de TEMED
 - 0,60 mL de persulfato de amônio 2%
 - 6,20 mL de água bidestilada
-

Apêndice I: Protocolos utilizados para detecção do *Picobirnavirus* pelas técnicas eletroforese em gel de poliacrilamida e RT-PCR.

- **Suspensão fecal – Extração bruta**
 - 100ul do extrato fecal
 - 1 ml de tampão TRIS/Ca⁺⁺ 1x
(Para amostras muito líquidas estabelecer a proporção 1:2)
 - Homogeneizar
 - Centrifugar 5 min a 3.000 rpm.
 - Recolher sobrenadante
 - Identificar e estocar em frascos a 4° C

- **Extração do RNA: associação das técnicas fenol/clorofórmio – álcool isoamílico e sílica/ isotiocianato de guanidina**
 - 450µl da suspensão fecal
 - *C + 250µl suspensão fecal +200ul ÁGUA AUTOCLAVADA
 - *C – 450µl de tampão TRIS/Ca⁺⁺ 1x
 - 50µl de SDS a 10%
 - Vortexar
 - Banho-maria por 30 minutos 56° C
 - Adicionar 500µl de Fenol/Clorofórmio- álcool isoamílico – Temperatura ambiente.
 - Homogeneizar em vórtex
 - Banho-maria a 56° C durante 15 min.
 - Centrifugar a 10.000 RPM/15 min.
 - Recolher sobrenadante em outro microtubo
 - 40µl de sílica hidratada
 - 500µl de solução L6
 - Homogeneizar em vórtex
 - Agitar durante 30 min
 - Armazenar em geladeira *overnight*
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 RPM durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 250µl de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 RPM durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 250µl de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 RPM durante 30 s.
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 1 mL de etanol a 70 %
 - Homogeneizar em vórtex

- Centrifugar a 10.000 RPM durante 30 s.
- Desprezar sobrenadante
- Adicionar 1 mL de etanol a 70 %
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 RPM durante 30 s.
- Desprezar sobrenadante
- Adicionar 1 mL de acetona PA
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 RPM durante 1min.
- Desprezar sobrenadante
- Secar o pellet em banho-maria à 56 ° C durante 15 min. (tubo aberto)
- Adicionar 50µl de água DEPC autoclavada
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria a 56° C durante 15 min. (tubo fechado)
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 RPM durante 2 min.
- Recolher sobrenadante em microtubo de 500ul
- Estocar a -20°C

- **RT-PCR para amplificação do PBV Genogrupo I**

- Desnaturação:

- 6ul RNA

- 2uL Primer Pico B25

- 2uL Água

- RT-PCR

- 5uL Buffer M-MLV 5x

- 1uL DNTP

- 0,6uL M-MLV

- 8,4uL Água

- PCR

- 5uL Buffer 10x

- 2uL MgCl₂

- 4uL DNTP

- 1uL Primer Pico B25

- 2uL Primer Pico B43

- 0,5uL Taq Polimerase

- 10,5uL Água

- **RT-PCR para amplificação do PBV Genogrupo II**

Desnaturação B23+B24

6µL RNA

2µL Primer B23

2µL Primer B24

RT-PCR

5µL Buffer 5x

1µL DNTP

0,6µL M-MLV

8,4µL Água

PCR

5µL Buffer 10x

2µL MgCl₂

4µL DNTP

1µL Primer B23

1µL Primer B24

0,5µL Taq

11,5µL Água

- **Condições do termociclador para RT-PCR Genogrupos I e II**

- Desnaturação: 94°C/6min (retirar do termo quando completar 5min e levar ao banho de gelo por 5min)

- RT-PCR:

-37°C/50min

-70°C/15min

-4°C -> at store

- PCR:

-94°C/2min

-94°C/1min

-50°C/1min

-72°C/1min

-72°C/7min

-4°C -> at store

} 40 x

- **Montagem das placas de eletroforese e aplicação das amostras:**

- Placas de vidro, espaçadores e pente: lavar com água e sabão, secar e limpar com álcool.
- Montar as duas placas de vidro separadas pelos espaçadores inferiores e laterais.
- Fixar as placas com grampos
- Selar as extremidades com ágar 2%.
- Adicionar gel inferior (gel de resolução) e aguardar a polimerização
- Adicionar o gel superior (gel de empilhamento)
- Introduzir o pente para formação das canaletas
- Aguardar polimerização
- Após completa polimerização do gel, fixar cuidadosamente as placas à cuba de eletroforese.
- Adicionar tampão de corrida nos reservatórios superior e inferior da cuba.
- Retirar espaçador inferior e o pente
- Adicionar amostras nas canaletas – amostras: alíquotar 15 µL de amostra de RNA + 3µL de tampão de amostra - em microtubo novo - banho-maria 56°C por 15 minutos.
- Após adição de todas as amostras, ligar a fonte da eletroforese e ajustar a corrente (inicialmente manter em 60V a 20mA; aumentar a corrente para 100V após a migração das amostras para o gel inferior).
- Aguardar a corrida eletroforética mediante visualização da migração do corante azul de bromofenol próximo ao limite inferior do gel de poliacrilamida

- **Coloração do gel de poliacrilamida**

- Após a eletroforese, transferir o gel em um recipiente e submergir em solução fixadora por 30 minutos (o gel pode permanecer por mais tempo nesta solução)
- Desprezar solução fixadora
- Adicionar a solução contendo o corante nitrato de prata. Deixar o gel por 30 minutos nesta solução, sob agitações periódicas
- Desprezar a solução corante; lavar o gel 2 vezes com água destilada
- Adicionar a solução reveladora
- Manter o gel na solução reveladora até visualização das bandas
- Após visualização das bandas, interromper a revelação pela adição da solução STOP por 15 minutos, no mínimo
- Manter o gel em solução conservadora até a secagem.

- **Corrida produto amplificado em gel de agarose:**

- Gel de agarose 2% (2g de agarose para 100ml de Tampão)
- Distribuir 2µL de tampão amostra em Parafilm
- Padrão molecular 0,7µL+2µL de tampão amostra

- Amostras 4 μ L+ 2 μ L de tampão amostra
- Aplicar amostras nas canaletas do gel agarose
- Colocar o gel na cuba de eletroforese, coberto por tampão TRIS/Ca++ 1x
- Ligar a fonte da eletroforese e ajustar a corrente (100V a 20mA).
- Aguardar a corrida eletroforética mediante visualização da migração do corante azul de bromofenol próximo ao limite inferior do gel de agarose.

- **Coloração gel agarose após corrida**

- Manter gel imerso por 30 minutos em solução contendo brometo de etídio
- Realizar enxágue do gel em água destilada
- Visualização do resultado colocando o gel sob luz ultravioleta