

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA FERNANDA KUNZ

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM  
HOSPEDEIRO OVINO**



PALOTINA

2017

ANDRESSA FERNANDA KUNZ

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM  
HOSPEDEIRO OVINO**

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 a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisabete Takiuchi

PALOTINA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

K95 Kunz, Andressa Fernanda  
Detecção e caracterização molecular de picobirnavirus  
em hospedeiro ovino / Andressa Fernanda Kunz.  
– Palotina, 2017  
76f.

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

1. Picobirnavirus. 2. Ovino. 3. EGPA. 4. RT-PCR. I. Takiuchi,  
Elisabete. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 636.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Setor PALOTINA  
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIA ANIMAL

## 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 ANDRESSA FERNANDA KUNZ intitulada: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM HOSPEDEIRO OVINO, após terem inquirido a aluna e realizado 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, 28 de Julho de 2017.

ELISABETE TAKIUCHI

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCO ANTÔNIO BACELLAR BARREIROS

Avaliador Externo (UFPR)

RÁQUEL FRAGA E SILVA RAIMONDO

Avaliador Externo (UFRGS)

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Andressa Fernanda Kunz, filha de Ildo José Kunz e Marilene Philippsen, natural de Missal, 02 de março de 1990. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina em 2015. No mesmo ano ingressou no mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina. Atuando principalmente na área de Virologia animal.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, sabedoria, saúde e por ter colocado no meu caminho pessoas tão especiais que tornaram esse momento possível.

À UFPR, local onde realizei minha graduação e agora estou concluindo o mestrado, totalizando 7 anos de aprendizado.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e à CAPES, pela oportunidade de continuar meus estudos e pela bolsa oferecida, com certeza isso colaborou muito para minha permanência em Palotina.

À banca avaliadora, Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Fraga e Silva Raimondo por terem aceito o convite.

À minha orientadora, Elisabete Takiuchi, que me assumiu como filha científica, direcionando toda minha trajetória desde o início da graduação, me mostrando como a pesquisa é fascinante e satisfatória quando trabalhamos com disciplina. Agradeço por se desdobrar e fazer possível o meu trabalho, pelas madrugadas corrigindo artigo e apesar de vários erros, sempre mostrava os meus pontos positivos. Além disso, obrigada pela amizade, companheirismo e preocupações de sempre. Adoro você, e espero sinceramente que nossos caminhos continuem se cruzando.

Ao Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, Prof. Dr. Amauri A. Alfieri e especialmente à doutoranda Flávia Possatti, que tornaram possível o sequenciamento genômico das amostras de PBV, parte fundamental do meu trabalho.

À equipe do Biotec coordenada pela professora Luciana e equipe de técnicos do bloco Multidisciplinar da UFPR Setor Palotina. Obrigada por compartilharem o espaço, assim como o uso dos equipamentos. Esse trabalho não seria possível sem a parceria de vocês.

Ao Prof. Dr. José Antônio de Freitas que não mediu esforços em ajudar com a escolha da propriedade, no acompanhamento das coletas e no esclarecimento de muitas dúvidas que tive no decorrer deste trabalho.

À toda equipe de orientadas da Virologia Animal. Às alunas de iniciação científica: Daniela, Ruana, Giulia e Carolina; PVA's: Rebeca, Carla, Jéssica e Paula, obrigada pelo auxílio nas coletas e no processamento laboratorial. Em especial, gostaria de agradecer as grandes amigas que fiz: Jéssica, Janaína, Izabel, Daniela,

Ruana e Cristiane. Primeiramente, obrigada pelo apoio e interesse no meu trabalho e pela disponibilidade em sempre poder ajudar. Obrigada também pela amizade, parceria, por estarem sempre na torcida para que tudo desse certo e por serem aquele ombro amigo para desabafos quando o resultado não era esperado. É um privilégio de poucos poder trabalhar entre amigos, espero que nossa amizade perdure por muito tempo, gosto muito de vocês suas kengas.

A família PH & cia... simplesmente por ser a melhor família do mundo, a mais animada, a mais unida e por estar na torcida sempre para que tudo dê certo.

Agradeço imensamente aos meus pais Marilene e Elso, pelo lindo exemplo que vocês são para mim. Obrigada por todos ensinamentos, principalmente por me ensinarem correr atrás dos meus sonhos e batalhar para que se tornassem possíveis. Obrigada pelo incentivo, por acreditarem em mim, por me esperarem nos finais de semana, e ter paciência de ouvir tudo o que eu tinha para contar sobre o meu trabalho, mesmo muitas vezes não entendendo do que eu estava falando. Se eu estou terminando esse mestrado, é graças a vocês e serei eternamente grata. Amo vocês.

Aos meus irmãos Alfredo, Lucas, Carolina e à minha cunhada Yasmine, obrigada por existirem e tornarem minha vida mais completa, o meu amor por vocês é incondicional.

Ao meu pai Ildo, gosto de acreditar que onde quer que esteja, está guiando meus passos aqui na Terra.

Ao meu namorado Anderson M. Grasel, que me acompanha desde o ensino médio, primeiro emprego, graduação e agora o mestrado. Obrigada por sua presença em minha vida, pelo apoio, incentivo, paciência, mas principalmente por me mostrar como é bom ter alguém para amar e traçar todo esse caminho comigo.

Rita, Lala e Maria, obrigada por me acolherem como parte da família.

A todos meus amigos, isso inclui todos que de alguma forma me apoiaram, por todas palavras de confiança, por torcerem por mim, vocês com certeza me motivaram a chegar até aqui.

E por fim agradeço a todos que acreditam que isso não é “só um mestrado”, na seriedade que envolve uma pesquisa científica, na lealdade e ética ao apresentar os resultados. Aqueles que acreditam que com pequenas descobertas podemos fazer grande diferença no futuro, Muito obrigada!

*“Só é digno da liberdade, como da vida, aquele que se empenha em conquistá-la.”*

Johan Goethe

## RESUMO

O *Picobirnavirus* (PBV) constitui um grupo de vírus emergentes pertencente à família *Picobirnaviridae*. São vírus com capsídeo icosaédrico, genoma formado por dois segmentos de RNA fita dupla, que podem infectar uma ampla gama de hospedeiros. Embora o vírus tenha sido detectado em animais com diarreia, alguns estudos têm sugerido que o PBV não possua uma relação etiológica com a diarreia, mas com diversas condições de imunossupressão que favorecem a replicação e excreção viral. Esse estudo relata a ocorrência de PBV em hospedeiros ovinos a partir de amostras fecais provenientes de um rebanho com aptidão para corte e a caracterização molecular dos isolados. Foram analisadas 100 amostras de fezes representativas de diferentes idades e categorias animais do rebanho. O PBV foi detectado em 5% (5/100) e 62% (62/100) das amostras pelas técnicas eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e RT-PCR, respectivamente. Todas as amostras PBV positivas na EGPA apresentaram o perfil “*large profile*”. Os produtos amplificados baseados na sequência parcial do gene RdRp foram caracterizados como genogrupo I do PBV (PBV-GI) após o sequenciamento genômico. A análise filogenética dos seis isolados de PBV ovino detectados neste estudo demonstrou alta heterogeneidade, apresentando maior identidade com PBV isolado de espécies heterólogas, (suínos e dromedário) ou detectado em efluentes de águas residuais urbanas em estações de tratamento. Este é o segundo relato de detecção do PBV em ovinos no mundo e o primeiro a demonstrar a alta prevalência do vírus em um rebanho ovino de exploração econômica, incluindo a caracterização molecular dos isolados.

**Palavras-chave:** Picobirnavírus, ovino, EGPA, RT-PCR.

## ABSTRACT

### DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PICOBIRNAVIRUS IN SHEEP HOST

*Picobirnavirus* (PBV) constitutes a group of emerging viruses belonging to the Family *Picobirnaviridae*. They are viruses with an icosahedral capsid and a genome formed by two double stranded RNA segments, which can infect a wide range of hosts. *Although the virus has already been detected in animals with diarrhea, some studies have suggested that PBV does not have an etiologic relationship with diarrhea, but with several immunosuppressive conditions that favor viral replication and excretion.* This study reports the occurrence of PBV in sheep hosts from fecal samples from a herd with meat production and the molecular characterization of the isolates. A hundred representative stool samples of different ages and animal categories of the herd were analyzed. PBV was detected in 5% (5/100) and 62% (62/100) of the samples by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and RT-PCR, respectively. All PBV positive samples in PAGE presented the "large" profile. Amplified products based on the partial sequence of the RdRp gene were characterized as PBV genogroup I (PBV-GI) after genomic sequencing. The phylogenetic analysis of the six isolates of ovine PBV detected in this study demonstrated high heterogeneity, presenting a higher identity with PBV isolated from heterologous species (swine and dromedary) or detected in urban wastewater in treatment plants. This is the second report of detection of PBV in sheep in the world and the first to demonstrate the high prevalence of the virus in a sheep herd of economic exploitation, including the molecular characterization of the isolates.

**Keywords:** Picobirnavirus, sheep, PAGE, RT-PCR.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**FIGURA 1** - Representação esquemática da organização do genoma de PBV, baseado na sequência completa de PBV em hospedeiro humano. .... 18

**FIGURA 2** - Perfis eletroforéticos de PBV large profile (linha 3) e small profile (linha 7) visualizados pela técnica eletroforese em gel de poliacrilamida comparados com o perfil de migração do rotavírus bovino A (linhas 1 e 4). ..... 19

## CAPÍTULO 1

**FIGURA 1** - Detecção de PBV em fezes de ovinos com aptidão para corte provenientes de uma propriedade localizada no município de Toledo, Paraná. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) seguida pela coloração por nitrato de prata. Linha 1: Perfil eletroforético de Rotavírus A bovino (controle positivo de extração e EGPA); linhas 2 e 3: amostras PBV positivas perfil "*large profile*"; linhas 4: controle negativo. B) RT-PCR para amplificação de fragmento de 201 pb do gene RdRp do PBV-GI. Linhas 1 e 12: Padrão de tamanho molecular de 100 pb; Linhas 2, 4, 5, 7, 9 e 11: amostras PBV-GI positivas; Linhas 3, 6 e 8 amostras PBV-GI negativas; Linha 10: controle negativo ..... 43

**FIGURA 2** - Relação filogenética entre variantes genômicas de PBV-GI baseada em 201 nucleotídeos do gene RdRp (segmento 2). As sequências obtidas neste estudo estão indicadas pelo símbolo ●. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Neighbor-Joining*, e o modelo evolutivo *Kimura 2* parâmetros com 1000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* são indicados próximos aos nós. As barras representam unidades de substituição por nucleotídeo. A amostra AF246940, referência para o PBV-GII, foi utilizada como grupo externo (outgroup) para enraizamento da árvore ..... 44

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

**TABELA 1** - Estudos de detecção de PBV em fezes coletadas de diferentes espécies hospedeiras de acordo com a localidade e método diagnóstico: .....21

## **CAPÍTULO 1**

<b>TABELA 1 - Distribuição de amostras positivas para PBV de acordo com a categoria animal e a técnica diagnóstica utilizada .....</b>	<b>42</b>
--	-----------

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA - DNA complementar  
CEUA - Comissão de ética no uso de animais  
dNTP - Desoxirribonucleotídeos trifosfatados  
dsRNA - RNA de dupla fita (*Double stranded RNA*)  
DPEC - dietilpirocarbonato  
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
EGPA - Eletroforese em gel de poliacrilamida  
GI - Genogrupo I  
GII - Genogrupo II  
HIV - Vírus da imunodeficiência humana  
ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (*International Committee of Taxonomy of Virus*)  
L - Litro  
Mm - milimolar  
M-MLV - *Moloney Murine Leukemia Virus*  
nm - nanômetro  
NSP1 - Proteína não estrutural (*Non structural protein*)  
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*)  
SDS - Sódio dodecil sulfato  
TBE - Tris, ácido Bórico e ácido etilenodiamino tetra-acético.  
µg - Micrograma  
µL - Microlitro  
UV - Radiação ultravioleta  
VLPs - Partícula semelhante a vírus (*Virus-like particle*)  
VP - Proteína viral (*Viral Protein*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
2.1 PROPRIEDADES GERAIS DO PICOBIRNAVIRUS .....	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	25
2.4 REFERÊNCIAS - REVISÃO DE LITERATURA.....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
<b>4 CAPÍTULO 1 - DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM HOSPEDEIRO OVINO</b> .....	<b>36</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	37
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.3 RESULTADOS .....	42
4.4 DISCUSSÃO .....	45
4.5 CONCLUSÃO.....	49
4.6 REFERÊNCIAS - CAPÍTULO 1 .....	50
<b>5 CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>54</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>
<b>APÊNDICES</b> .....	<b>63</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

*Picobirnavirus* (PBV) é o único gênero pertencente à família *Picobirnaviridae* (DELMAS, 2011). São considerados vírus emergentes, não envelopados, com capsídeo icosaédrico cuja nomenclatura baseia-se nas características estruturais do vírus: o prefixo “Pico” refere-se ao pequeno tamanho do *virion* (35-40 nm de diâmetro) e “birna” devido ao RNA de cadeia dupla bí-segmentado do genoma viral (PEREIRA et al., 1988a).

Apesar de inúmeros relatos da presença do vírus em amostras fecais diarreicas das diferentes espécies hospedeiras, a participação do PBV como agente causal das diarreias é ainda bastante controversa. (HAGA et al., 1999; KYLLA et al., 2017; MASACHESSI et al., 2007; PEREIRA et al., 1988a; SUN et al., 2016; WANG et al., 2007). Alguns estudos epidemiológicos realizados em humanos e suínos principalmente, têm refutado essa associação, caracterizando-o como um vírus de caráter oportunista em condições de imunossupressão (induzida ou fisiológica) do hospedeiro (GIORDANO et al., 1999; MARTINEZ et al., 2010; VALLE et al., 2001).

Não está evidente se a epidemiologia do PBV é influenciada pela restrição das espécies hospedeiras ou se os animais podem atuar como reservatórios de infecção para humanos. Considerando a não adaptação do PBV em culturas celulares *in vitro*, as propriedades antigênicas e os mecanismos de patogenicidade viral ainda são pouco esclarecidos (NATES, GATTI e LUDERT, 2011). Desta forma, os estudos mais recentes têm recorrido às técnicas moleculares de caracterização genômica que possam elucidar os aspectos de variabilidade genética e de transmissão interespecie (BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GANESH et al., 2010; GANESH et al., 2011).

Desde sua primeira detecção em amostras fecais de crianças, a ocorrência de PBV tem sido relatada em diversas espécies distribuídas mundialmente como: mamíferos terrestres e aquáticos, aves e répteis (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014; KATTOOR et al., 2016; PEREIRA et al., 1988a). Entretanto, na espécie ovina, o PBV foi detectado nas fezes de um único animal na Espanha e até nosso conhecimento são inexistentes estudos que tentam elucidar o comportamento do vírus dentro de um rebanho de exploração econômica (MUNOZ et al., 1996).

Diante do exposto, o escopo deste estudo é investigar a ocorrência de PBV em hospedeiros ovinos com aptidão para corte e avaliar a frequência de distribuição da infecção entre as diferentes categorias animais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PROPRIEDADES GERAIS DO PICOBIRNAVIRUS

O gênero *Picobirnavirus* (PBV) constitui um grupo de vírus emergentes, distribuídos em todo mundo e que infectam uma ampla variedade de hospedeiros vertebrados, inclusive humanos (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

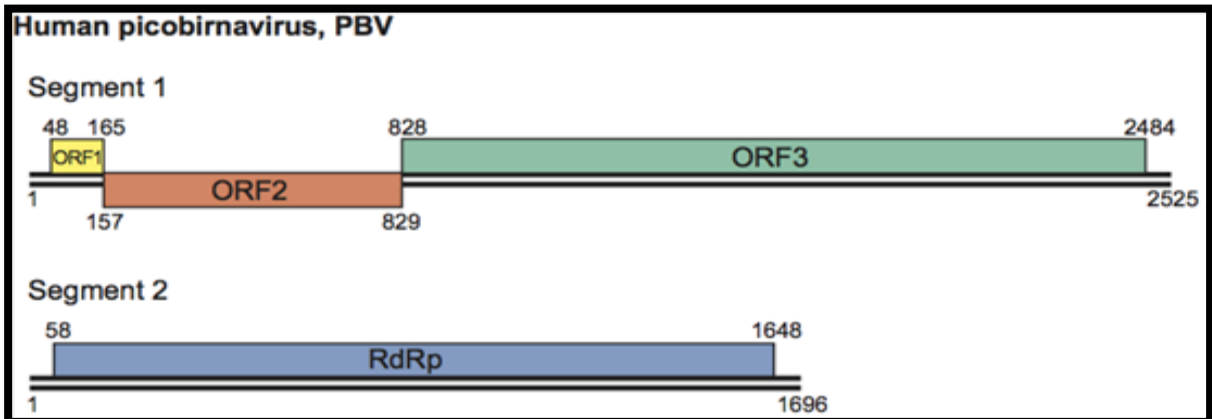
Inicialmente o PBV foi classificado na família *Birnaviridae* (PEREIRA et al., 1988a). Entretanto, pesquisas posteriores mostraram que o PBV não compartilhava propriedades físico-químicas ou similaridade genética com os vírus dessa família e assim foi classificado como o único gênero pertencente à Família *Picobirnaviridae* (DELMAS, 2011).

O gênero PBV possui duas espécies classificadas pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV): *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus* (DELMAS, 2011). A nomenclatura está relacionada à sua estrutura: onde o prefixo “pico” faz referência ao pequeno tamanho (35-40nm de diâmetro), “bi” por se tratar de um genoma bissegmentado e “RNA” caracterizando a natureza do genoma viral (PEREIRA et al., 1988a).

Os PBV são vírus não envelopados, com capsídeo icosaédrico que envolve dois segmentos de RNA genômico, denominados de segmento 1 (segmento maior) com tamanho entre 2,2 a 2,7 kb, e segmento 2 (segmento menor) com tamanho variando entre 1,2 a 1,9 kb. O tamanho dos segmentos genômicos do PBV é estimado com base no perfil de migração eletroforética do genoma segmentado (11 segmentos) de uma cepa padrão de rotavírus bovino (LUDERT et al., 1991).

A organização do genoma do PBV (FIGURA 1) é baseada a partir do primeiro sequenciamento completo de PBV proveniente de uma criança com gastroenterite na Tailândia (WAKUDA, PONGSUWANNA e TANIGUCHI, 2005). O segmento 1 apresenta três fases de leitura (ORF): a ORF1, com 39 aminoácidos, a ORF2 com 224 aminoácidos, que codifica uma proteína hidrofílica sem função conhecida e a ORF 3 que expressa um precursor de uma proteína estrutural do capsídeo viral com 590 aminoácidos. O segmento 2, apresenta somente uma ORF, responsável por codificar uma RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (DELMAS, 2011; WAKUDA, PONGSUWANNA e TANIGUCHI, 2005).

**FIGURA 1** - Representação esquemática da organização do genoma de PBV, baseado na sequência completa de PBV em hospedeiro humano.

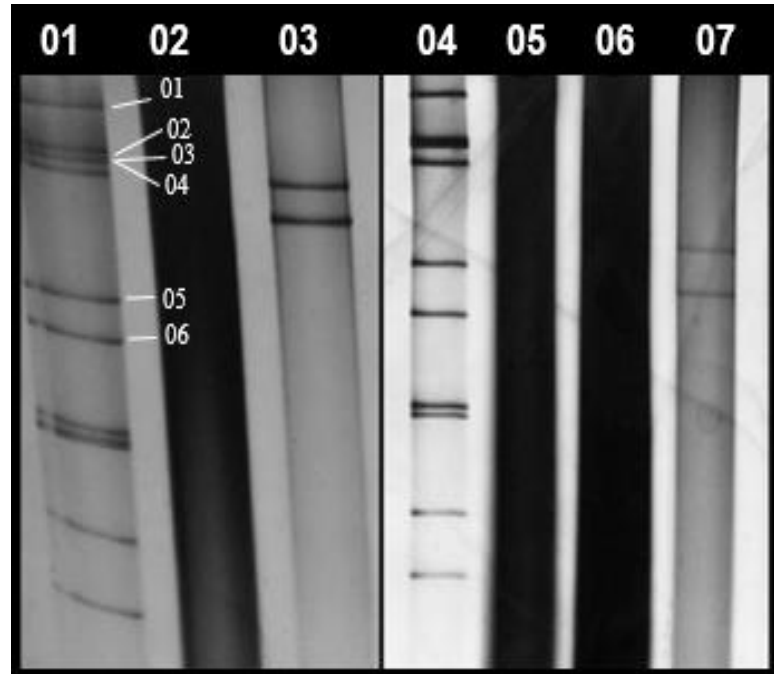


Fonte: DELMAS (2011)

Com base no sequenciamento genômico e variabilidade genética do gene RdRp (segmento 2), o PBV é classificado em genogrupos distintos: o genogrupo I (GI) e genogrupo II (GII) baseados nas estirpes de referência 1-CHN-97 e 4-GA-91, respectivamente. Ambas correspondem aos PBV detectados em amostras fecais de humanos e apresentam identidade entre 17-28% para sequência deduzida de aminoácidos (BANYAI et al., 2003; ROSEN et al., 2000). Recentemente, um estudo realizado na Holanda demonstrou baixa identidade (19,4 a 26,1%) de aminoácidos do gene que codifica a RdRp de PBV humanos quando comparado com os genogrupos I e II, sugerindo a incorporação de um novo genogrupo (genogrupo III) na classificação do PBV (SMITS et al., 2014).

De acordo com o perfil de migração dos dois segmentos de RNA em eletroforese em gel de poliácridamida (EGPA), o PBV também pode ser classificado em dois padrões: Perfil “*small profile*” e Perfil “*large profile*”. No *large profile*, os tamanhos estimados do maior e menor segmento correspondem a 2,7kb e 1,9 kb, respectivamente. Considerando o *small profile*, o segmento 1 tem 2,2 kb e o segmento 2 tem 1,2 kb, aproximadamente (GANESH et al., 2012; GATTI et al., 1989; MALIK et al., 2014).

**FIGURA 2** - Perfis eletroforéticos de PBV *large profile* (linha 3) e *small profile* (linha 7) visualizados pela técnica eletroforese em gel de poliacrilamida comparados com o perfil de migração do rotavírus bovino A (linhas 1 e 4).



Fonte: TAKIUCHI et al., (2016)

A nomenclatura oficial para caracterizar o PBV foi proposta em 2009, iniciando com a especificação do genogrupo (GI ou GII), seguido por PBV, espécie hospedeira, país de isolamento (abreviado em três letras), identificação da amostra e ano de isolamento; todas as informações separadas por barras. O exemplo GI/PBV/human/CHN/1-CHN 97/1997 refere-se à amostra 1-CHN97, isolada de uma criança na China, em 1997, e que foi caracterizada como PBV-GI (FREGOLENTE e GATTI, 2009).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

O primeiro relato de ocorrência do PBV data de 1988 no Brasil (PEREIRA et al., 1988a), que foi constituído como um achado ocasional durante a investigação do rotavírus em fezes diarreicas de crianças pela técnica EGPA. Desde então, o PBV tem sido detectado em fezes de humanos de diferentes localizações geográficas do mundo, além de diversas espécies animais, incluindo mamíferos, aves e répteis, utilizando técnicas de EGPA, RT-PCR e mais recentemente a metagenômica. A representação da detecção de PBV em fezes de diversos hospedeiros distribuídos pelo mundo todo estão listadas na Tabela 1.

**TABELA 1** - Trabalhos de detecção de PBV em fezes coletadas de diferentes espécies animais de acordo com a localidade e método diagnóstico:

<b>Espécie animal</b>	<b>País</b>	<b>Técnica diagnóstica</b>	<b>Referência</b>
Animais de cativeiro	Argentina	EGPA	(MASACHESSI et al., 2007)
Bovinos	Russia	EGPA	(VANOPDENBOSCH e WELLEMANS, 1989)
	Bélgica	EGPA	(VILLACORTA et al., 1991)
	Brasil	EGPA	(BUZINARO et al., 2003)
	India	EGPA/RT-PCR	(MALIK et al., 2013)
	Brasil	EGPA/RT-PCR	(TAKIUCHI et al., 2016)
Cães	Brasil	EGPA	(VOLOTAO et al., 2001)
	Brasil	EGPA	(COSTA et al., 2004)
	Brasil	EGPA/RT-PCR	(FREGOLENTE et al., 2009)
Cobra	Brasil	EGPA/RT-PCR	(FREGOLENTE et al., 2009)
Coelhos	Reino Unido	EGPA	(GALLIMORE, LEWIS e BROWN, 1993)
	Venezuela	EGPA	(LUDERT et al., 1995)
	Reino Unido	EGPA/RT-PCR	(GREEN et al., 1999)
Equinos	Grã Betanha e Irlanda	EGPA	(BROWNING et al., 1991)
	Estados Unidos	Metagenômica	(LI et al., 2015)
Frangos	Brasil	EGPA	(ALFIERI et al., 1988)
	Brasil	EGPA	(LEITE et al., 1990)
	Brasil	EGPA/ RT-PCR	(RIBEIRO SILVA et al., 2014)
	Brasil	EGPA	(TAMEHIRO et al., 2003)
Gato	Portugal	Metagenômica	(NG et al., 2014)
Leão marinho	Hong Kong	EGPA RT-PCR	(WOO et al., 2012)
Lobo	Portugal	RT-PCR	(CONCEICAO-NETO et al., 2016)
Macaco	China	EGPA	(WANG et al., 2012)
Morcego	Hong Kong	RT-PCR	(WOO et al., 2016)
Ovinos	Espanha	EGPA	(MUNOZ et al., 1996)
Pantera, onça, puma	Uruguai	EGPA	(GILLMAN, SANCHEZ e ARBIZA, 2013)
	Perus	Estados Unidos	Metagenômica
Raposa vermelha	Holanda	EGPA/RT-PCR	(BODEWES et al., 2013)
Ratos	Brasil	EGPA	(PEREIRA et al., 1988b)
	Brasil	EGPA/ RT-PCR	(FREGOLENTE et al., 2009)
Suínos	Brasil	EGPA	(GATTI et al., 1989)
	Brasil	EGPA	(ALFIERI et al., 1994)
	Hungria	EGPA/ RT-PCR	(BANYAI et al., 2008)
	Venezuela	EGPA/ RT-PCR	(CARRUYO et al., 2008)
	Argentina	EGPA/RT-PCR	(GIORDANO et al., 2011)
Tamanduá bandeira	Brasil	EGPA	(HAGA et al., 1999)

Existem vários relatos de PBV em humanos distribuídos pelo mundo, com frequências que variam de 0,09% (GIORDANO et al., 2008) a 13% (GALLIMORE et al., 1995). Já em animais, as frequências podem chegar até 65% em suínos (BANYAI et al., 2008), 49,4% em frangos (RIBEIRO SILVA et al., 2014), 14,3% em equinos (GANESH et al., 2011), 8,3% em bovinos (TAKIUCHI et al., 2016) e 1,8% em caninos (COSTA et al., 2004). As diferenças nas frequências observadas estão relacionadas principalmente à técnica utilizada, o local e período de estudo, condições adversas do hospedeiro (imunossupressão, estado fisiológico), espécie analisada e o tamanho da amostragem (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

O PBV tem sido relatado tanto em indivíduos com diarreia (KYLLA et al., 2017; SUN et al., 2016) como em indivíduos assintomáticos (FREGOLANTE et al., 2009; HAGA et al., 1999; MASACHESSI et al., 2007; PEREIRA et al., 1988a; WANG et al., 2007). Entretanto, alguns trabalhos realizados para investigar a associação de PBV com gastroenterite apresentaram resultados contraditórios (MALIK et al., 2014).

Gatti et al., (1989) foram os primeiros autores a tentar esclarecer a relação do PBV como agente etiológico de diarreia em animais. Analisando as amostras de fezes pela EGPA, 15,3% das amostras PBV positivas eram diarreicas e 9,6% apresentavam consistência normal. Em contraste, Ludert et al., (1991) relataram 11,1% de positividade, porém sem demonstrar a associação de infecção do PBV com diarreia. Martinez et al., (2010) detectaram o PBV em 21,13% das amostras fecais de suínos, das quais 98% tinham consistência normal. Em aves, a detecção de PBV foi mais frequentemente relatada em fezes de consistência pastosa (ALFIERI et al., 1988; RIBEIRO SILVA et al., 2014; TAMEHIRO et al., 2003).

Diferente das pesquisas envolvendo PBV em humanos e suínos, os estudos epidemiológicos e moleculares para ruminantes de produção ainda são escassos, existindo apenas relatos na Bélgica, Índia e Brasil (BUZINARO et al., 2003; GHOSH et al., 2009; MALIK et al., 2011; TAKIUCHI et al., 2016; VANOPDENBOSCH e WELLEMANS, 1989). Considerando bovinos e bubalinos, as frequências de PBV foram de 0,69% (4/576) (BUZINARO et al., 2003), 1,29% (1/78) (GHOSH et al., 2009), 3,67% (5/136) (MALIK et al., 2011) e 8,3% (24/289) (TAKIUCHI et al., 2016). Nesses casos, a relação de PBV com a síndrome diarreica se manteve inconclusiva.

Em uma pesquisa realizada na Espanha, com o objetivo de estimar a prevalência de diferentes enteropatógenos envolvidos na diarreia neonatal de pequenos ruminantes, o PBV foi encontrado em 0,4% (1/226) de fezes de ovinos,

utilizando EGPA como ferramenta diagnóstica. Nesse trabalho, *Cryptosporidium parvum* foi o enteropatógeno mais frequente (45%), seguido de *Escherichia coli* (26%) e rotavírus espécie A (2,1%) (MUNOZ et al., 1996). Até o momento, essa foi a única detecção de PBV na espécie ovina.

Embora muitos relatos não evidenciem o PBV como o agente etiológico primário da diarreia, fatores como imunossupressão, síndrome de estresse, doenças clínicas concomitantes e condições ambientais adversas, foram apontados por favorecer a replicação do PBV e estabelecer o aparecimento de sinais clínicos e uma infecção persistente (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

O PBV tem sido frequentemente associado a outros patógenos já conhecidos por causar diarreia em humanos e animais, como o rotavírus (ALFIERI et al., 1994; BHATTACHARYA et al., 2007; GIORDANO et al., 2008), astrovírus, *Salmonella* (BHATTACHARYA et al., 2007), calicivirus (BANYAI et al., 2003), *Escherichia coli* (BARRETO et al., 2006), reforçando a hipótese de que ele atue como um agente secundário e oportunista (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

Existem evidências de que o PBV esteja envolvido em quadros de gastroenterite em indivíduos imunossuprimidos. Em humanos, foram observadas frequências significativas de PBV em quadros de diarreia crônica em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), além de observar períodos prolongados de excreção viral (GIORDANO et al., 1998; GIORDANO et al., 1999; GONZALEZ et al., 1998; GROHMANN et al., 1993). Indivíduos que foram submetidos ao transplante renal e receberam tratamentos com imunossupressores também excretaram o PBV nas fezes (VALLE et al., 2001).

Já em animais, a maior excreção do PBV nas fezes de suínos foi observada em porcas no período gestacional e durante a lactação, sugerindo uma associação com o estresse fisiológico. Além disso, foi relatado que a excreção do PBV é prolongada e intermitente, sendo intercalada por períodos de excreção viral alta, baixa ou ausente nas fezes, e implicando na possível participação dos suínos como reservatórios do vírus (MARTINEZ et al., 2010).

A interação vírus-hospedeiro, bem como os fatores que facilitam a maior excreção viral em mamíferos e aves estão sendo melhor compreendidas, graças a estudos epidemiológicos longitudinais realizados na Argentina. Os resultados demonstram que a infecção por PBV ocorre no início da vida dos hospedeiros, caracterizando uma infecção persistente, com padrão assintomático que perdura até

o início da fase adulta (MARTINEZ et al., 2010; MASACHESSI et al., 2012). A fim de investigar a manutenção da infecção por PBV durante a fase adulta, foi realizada avaliação das fezes de um orangotango num período de três anos, conferindo períodos intercalados de excreção viral, detectados por EGPA e RT-PCR, com períodos sem detecção (MASACHESSI et al., 2015).

Além disso, há vários relatos de excreção de PBV em animais (com e sem diarreia) mantidos em cativeiro, sugerindo que o estresse provocado pelo isolamento constitui um fator predisponente para a imunossupressão e replicação viral (FREGOLENTE et al., 2009; HAGA et al., 1999; MASACHESSI et al., 2007).

O PBV, desde a sua descoberta em 1988, foi considerado um vírus essencialmente entérico, visto que todos os trabalhos reportavam a detecção do vírus nas fezes (KATTOOR et al., 2016; PEREIRA et al., 1988a). Somente em 2011 foi relatada a presença de PBV GI e GII em amostras de *swabs* nasais de suínos coletadas em abatedouros na China, Hong Kong e Sri Lanka (SMITS et al., 2011). Posteriormente, foi realizada a detecção de PBV GI em lavados traqueais em humanos, expandindo o conhecimento sobre o tropismo do PBV. Entretanto, devido à ausência de sinais clínicos respiratórios, a participação deste vírus como patógeno respiratório primário permanece incerta (SMITS et al., 2012).

Na realização de monitoramento ambiental, o PBV foi detectado em 100% dos esgotos analisados antes do tratamento nos Estados Unidos e na China (ZHANG, et al., 2015; SYMONDS, GRIFFIN e BREITBART, 2009). A análise dos mesmos esgotos após o tratamento, ainda detectaram o PBV em 33% das amostras. Ambos os trabalhos mostraram que o PBV é potencialmente um indicador de contaminação fecal (SYMONDS, GRIFFIN e BREITBART, 2009).

A análise filogenética do segmento 2 de PBV detectado em humanos na Índia, demonstrou maior homologia com PBV isolados de suínos na Hungria, com 85%-92% de identidade para nucleotídeos e 84%-95% de identidade para aminoácidos, sugerindo que as estirpes de PBV humanas e suínas pertencem a um ancestral comum (GANESH et al., 2010). Resultado semelhante foi encontrado quando comparado ao PBV detectado em esgoto, que apresentou 83-100% de identidade com sequências de PBV humanos e suínos (SYMONDS, GRIFFIN e BREITBART, 2009). Em outra análise realizada por Ganesh, et al., (2011), a comparação da sequência de um PBV detectado em equino revelou alta relação genética (> 98% de identidade de nucleotídeos) com uma amostra de PBV humana detectada na mesma região da Índia.

Essas informações sugerem a possibilidade de transmissão interespecie e com potencial zoonótico desse vírus (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

Assim como já descrito com outros vírus segmentados como o rotavírus e influenzavírus, é possível que ocorra o ressortimento de segmentos genômicos nos casos de co-infecções com PBV de diferentes espécies hospedeiras. Isso foi comprovado recentemente em PBV isolados de lobo, sendo que o segmento 1 apresentou maior homologia com PBV de suíno e o segmento 2 com PBV de dromedário (CONCEICAO-NETO et al., 2016).

Curiosamente, estudos tem demonstrado que sequências de PBV são relacionadas heterogeneamente dentro de uma propriedade, mas apresentam maior similaridade com sequências de localidades distintas, mesmo considerando populações homogêneas. Essa natureza heterogênea de PBV detectado em humanos e animais distribuídos mundialmente, podem ser influenciados por uma fonte de contaminação comum, e somada com a capacidade de infecção interespecie do vírus, consegue se disseminar rapidamente (BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; RIBEIRO SILVA et al., 2014).

A alta variabilidade genética do PBV e sua capacidade de adaptação a uma ampla gama de espécies hospedeiras, reforçam a necessidade de novos estudos clínicos, epidemiológicos e que avaliem principalmente os aspectos de saúde pública desta virose emergente (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014; KATTOOR et al., 2016; MALIK et al., 2014).

### 2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

A incapacidade de adaptação em culturas celulares *in vitro* e a falta de um modelo animal permissivo para PBV, impede a preparação de insumos para o desenvolvimento de testes imunodiagnósticos para detecção indireta de PBV (FREGOLENTE et al., 2009). Dessa forma, o diagnóstico fica limitado na detecção direta de PBV pelas técnicas de microscopia eletrônica, EGPA, RT-PCR e mais recentemente a análise metagenômica.

No início das pesquisas a microscopia eletrônica foi muito utilizada, identificando partículas esféricas, com aproximadamente 35nm de diâmetro e superfície icosaédrica característicos de PBV (BUZINARO et al., 2003; GALLIMORE; LEWIS; BROWN, 1993; HAGA et al., 1999; PEREIRA et al., 1988a).

A característica bissegmentada do genoma de PBV permite a sua detecção pela técnica de EGPA seguida pela coloração por nitrato de prata (PEREIRA et al., 1988a). Considerada padrão ouro para diagnóstico de PBV, a EGPA é altamente específica, e permite a caracterização de PBV de acordo com a mobilidade eletroforética dos segmentos do genoma viral. Contudo, é uma técnica pouco sensível, pois são requeridos altos títulos de excreção viral para visualização do genoma viral no gel de poliacrilamida (LUDERT et al., 1991).

A técnica de EGPA permite a separação dos dois segmentos genômicos de RNA de acordo com o peso molecular, diferenciando os perfis de migração do PBV em perfil *small profile* (Segmento 1 com 2,2 kb e segmento 2 com 1,2 kb) e perfil *large profile* (segmento 1 com 2,7 kb e o segmento 2 com 1,9 kb). Para o diagnóstico de PBV, são frequentemente utilizados genomas de rotavírus espécie A como marcadores moleculares em géis de poliacrilamida, onde o segmento maior fica ligeiramente acima do gene da VP2 e enquanto o segmento menor tem migração entre os genes VP4 e NSP1 do rotavírus (GHOSH et al., 2009).

Grande parte das detecções de PBV inicialmente foram realizadas através de EGPA. No entanto, devido à baixa sensibilidade dessa técnica, a RT-PCR começou a ser utilizada no início dos anos 2000 e aumentou a taxa de detecção em aproximadamente 100 vezes em comparação com EGPA, e tem sido mundialmente utilizada para detecção de PBV em diferentes espécies (ROSEN et al., 2000). Essa técnica apresenta alta sensibilidade e especificidade e permite a diferenciação dos PBV em GI e GII, além de possibilitar a caracterização genômica e análise filogenética das amostras de PBV (FREGOLENTE et al., 2009).

E mais recentemente, com o advento da metagenômica, tem sido apresentada a grande diversidade microbiana em fezes de humanos e animais (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014). A principal vantagem dessa técnica, é que ela permite a exploração das comunidades microbianas existentes na amostra estudada, possibilitando inclusive, caracterizar genomas mistos de vírus que não são cultiváveis, como é o caso do PBV (ZHANG et al., 2006).

Diversos relatos têm demonstrado a presença significativa do PBV na microbiota fecal de diferentes hospedeiros (ANTHONY et al., 2015; BODEWES et al., 2014; DAY et al., 2010; FINKBEINER et al., 2008). A utilização da metagenômica em uma pesquisa realizada em Bangladesh, encontrou 184 diferentes sequências de vírus de origem humana em fezes de macacos, dos quais 120 eram PBV. Dessa

forma, a utilização dessa técnica mostrou que o PBV está presente de forma abundante na microbiota animal e merece ser mais estudado (ANTHONY et al., 2015).

## 2.4 REFERÊNCIAS - REVISÃO DE LITERATURA

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.

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.

ANTHONY, S. J.; ISLAM, A.; JOHNSON, C.; NAVARRETE-MACIAS, I.; LIANG, E.; JAIN, K.; HITCHENS, P. L.; CHE, X.; SOLOYVOV, A.; HICKS, A. L.; OJEDA-FLORES, R.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; ULRICH, W.; ROSTAL, M. K.; PETROSOV, A.; GARCIA, J.; HAIDER, N.; WOLFE, N.; GOLDSTEIN, T.; MORSE, S. S.; RAHMAN, M.; EPSTEIN, J. H.; MAZET, J. K.; DASZAK, P.; LIPKIN, W. I. Non-random patterns in viral diversity. **Nature communications**, v. 6, p. 8147, 2015.

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, 2007.

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.

BODEWES, R.; RUIZ-GONZALEZ, A.; SCHAPENDONK, C. M.; VAN DEN BRAND, J. M.; OSTERHAUS, A. D.; SMITS, S. L. Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. **Virology journal**, v. 11, p. 89, 2014.

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

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.

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.

COSTA, A.; CUBEL GARCIA, R.; LABARTHE, N.; LEITE, J. Detection of double-stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 554-557, 2004.

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

DELMAS, B. Family Picobirnaviridae. **Proceedings of the Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 535-539, 2011.

FINKBEINER, S. R.; ALLRED, A. F.; TARR, P. I.; KLEIN, E. J.; KIRKWOOD, C. D.; WANG, D. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. 1-9, 2008.

FREGOLANTE, 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.

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

GALLIMORE, C.; LEWIS, D.; BROWN, D. Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. **Archives of virology**, v. 133, n. 1-2, p. 63-73, 1993.

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.; 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.

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

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.

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

GILLMAN, L.; SANCHEZ, A. M.; ARBIZA, J. Picobirnavirus in captive animals from Uruguay: identification of new hosts. **Intervirology**, v. 56, n. 1, p. 46-49, 2013.

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.; 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.; 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.

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.

- 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, n. 4, p. 288-292, 1998.
- GREEN, J.; GALLIMORE, C.; CLEWLEY, J.; BROWN, D. Genomic characterisation of the large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobirnavirus of *Cryptosporidium parvum*. **Archives of virology**, v. 144, n. 12, p. 2457-2465, 1999.
- 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.
- KATTOOR, J.; SIRCAR, S.; SAURAB, S.; SUBRAMANIYAN, S.; DHAMA, K.; MALIK, Y. Picobirnavirus: A putative emerging threat to humans and animals. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 6, p. 327-331, 2016.
- 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.
- LEITE, J. P. G.; MONTEIRO, S.; FIALHO, A.; PEREIRA, H. A novel avian virus with trisegmented double-stranded RNA and further observations on previously described similar viruses with bisegmented genome. **Virus research**, v. 16, n. 2, p. 119-126, 1990.
- 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.
- 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.
- LUDERT, J. E.; ABDUL-LATIFF, L.; LIPRANDI, A.; LIPRANDI, F. Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double stranded RNA, in rabbit faeces. **Research in veterinary science**, v. 59, n. 3, p. 222-225, 1995.
- MALIK, Y. S.; CHANDRASHEKAR, K. M.; SHARMA, K.; HAQ, A. A.; VAID, N.; CHAKRAVARTI, S.; BATRA, M.; SINGH, R.; PANDEY, A. B. Picobirnavirus detection in bovine and buffalo calves from foothills of Himalaya and Central India. **Tropical animal health and production**, v. 43, n. 8, p. 1475-1478, 2011.

MALIK, Y. S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; SHARMA, A. K.; SIRCAR, S.; JEENA, L. M.; SINGH, N. K.; MONDAL, A.; JOARDAR, S. N.; BALASUBRAMANIAN, G. Molecular characterization of a genetically diverse bubaline picobirnavirus strain, India. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 4, p. 609, 2013.

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.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, B. M.; FERREYRA, L.; VILLAREAL, D.; CARELLO, M.; ASIS, C.; NATES, S. V. Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. **Archives of virology**, v. 152, n. 5, p. 989-998, 2007.

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.

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.

MUNOZ, M.; ALVAREZ, M.; LANZA, I.; CARMENES, P. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. **Epidemiology and infection**, v. 117, n. 1, p. 203-211, 1996.

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.

NG, T. F.; MESQUITA, J. R.; NASCIMENTO, M. S.; KONDOV, N. O.; WONG, W.; REUTER, G.; KNOWLES, N. J.; VEGA, E.; ESONA, M. D.; DENG, X.; VINJE, J.; DELWART, E. Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. **Veterinary microbiology**, v. 171, n. 1-2, p. 102-111, 2014.

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.

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.; 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.

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.

SYMONDS, E. M.; GRIFFIN, D. W.; BREITBART, M. Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 5, p. 1402-1409, 2009.

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.

VANOPDENBOSCH, E.; WELLEMANS, G. Birna-type virus in diarrhoeic calf faeces. **The Veterinary record**, v. 125, n. 24, p. 610, 1989.

VILLACORTA, I.; PEETERS, J. E.; VANOPDENBOSCH, E.; ARES-MAZAS, E.; THEYS, H. Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 2, p. 283-287, 1991.

VOLOTAO, E. M.; SOARES, C. C.; ALBUQUERQUE, M. C.; DA SILVA, F. M.; CARVALHO, T. R.; MARINS, L. P.; D'OLIVEIRA, I. C.; SANTOS, N. First evidence of a trisegmented double-stranded RNA virus in canine faeces. **Veterinary journal**, v. 161, n. 2, p. 205-207, 2001.

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.; TU, X.; HUMPHREY, C.; MCCLURE, H.; JIANG, X.; QIN, C.; GLASS, R. I.; JIANG, B. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. **Journal of medical primatology**, v. 36, n. 2, p. 101-107, 2007.

WANG, Y.; BANYAI, K.; TU, X.; JIANG, B. Simian genogroup I picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2779-2782, 2012.

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.; BAI, R.; FENG, R.; ZHANG, H.; LIU, L. Detection and evolutionary analysis of picobirnaviruses in treated wastewater. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 474-482, 2015.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência de *Picobirnavirus* (PBV) em hospedeiros ovinos e caracterizar molecularmente os isolados de PBV provenientes de um rebanho com aptidão para corte no município de Toledo, Paraná.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar o genoma do PBV em fezes de ovinos utilizando as técnicas eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e RT-PCR;
- Avaliar a frequência e distribuição da infecção pelo PBV de acordo com a idade, condição clínica e categoria animal;
- Caracterizar molecularmente os isolados de PBV por meio do sequenciamento e análise filogenética baseada na sequência parcial do gene RdRp do PBV.

## 4 CAPÍTULO 1 - DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PICOBIRNAVIRUS EM HOSPEDEIRO OVINO

### RESUMO:

O *Picobirnavirus* (PBV) constitui um grupo de vírus emergentes pertencente à família *Picobirnaviridae*. São vírus com capsídeo icosaédrico, genoma formado por dois segmentos de RNA fita dupla, que podem infectar uma ampla gama de hospedeiros. Embora o vírus tenha sido detectado em animais com diarreia, alguns estudos têm sugerido que o PBV não possua uma relação etiológica com a diarreia, mas com diversas condições de imunossupressão que favorecem a replicação e excreção viral. Esse estudo relata a ocorrência de PBV em hospedeiros ovinos a partir de amostras fecais provenientes de um rebanho com aptidão para corte e a caracterização molecular dos isolados. Foram analisadas 100 amostras de fezes representativas de diferentes idades e categorias animais do rebanho. O PBV foi detectado em 5% (5/100) e 62% (62/100) das amostras pelas técnicas eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e RT-PCR, respectivamente. Todas as amostras PBV positivas na EGPA apresentaram o perfil “*large profile*”. Os produtos amplificados baseados na sequência parcial do gene RdRp foram caracterizados como genogrupo I do PBV (PBV-GI) após o sequenciamento genômico. A análise filogenética dos seis isolados de PBV ovino detectados neste trabalho demonstrou alta heterogeneidade, apresentando maior identidade com PBV isolado de espécies heterólogas, (suínos e dromedário) ou detectado em efluentes de águas residuais urbanas em estações de tratamento. Este é o segundo relato de detecção do PBV em ovinos no mundo e o primeiro a demonstrar a alta prevalência do vírus em um rebanho ovino de exploração econômica, incluindo a caracterização molecular dos isolados.

**Palavras-chave:** Picobirnavírus, ovino, EGPA, RT-PCR.

## 4.1 INTRODUÇÃO

*Picobirnavirus* (PBV) é o único gênero pertencente à família *Picobirnaviridae*, tendo sido reconhecidas apenas duas espécies pelo Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV): *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus* (DELMAS, 2011).

Os PBV são considerados vírus emergentes, não envelopados, com capsídeo icosaédrico e genoma constituído por dois segmentos de RNA de fita dupla. O segmento 1 (2,2 a 2,7 kb) codifica a proteína do capsídeo e o segmento 2 (1,2 a 1,9 kb) a enzima viral RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (NATES, GATTI e LUDERT, 2011). De acordo com o padrão de migração dos segmentos genômicos em eletroforese em gel de poliacrilamida (EPGA), o PBV é classificado nos perfis “*large profile*” ou “*small profile*” (GANESH et al., 2012; GATTI et al., 1989; MALIK et al., 2014). Devido à alta variabilidade genética do segmento 2 (RdRp), os PBV são caracterizados em genogrupo I (GI) e genogrupo II (GII) (BANYAI et al., 2003; ROSEN et al., 2000). Recentemente, foi proposta a inclusão do genogrupo (GIII), após a detecção de PBV altamente divergentes em fezes diarreicas de humanos (SMITS et al., 2014).

A participação do PBV como agente causal das diarreias é ainda controversa. O vírus tem sido detectado em indivíduos sintomáticos e assintomáticos com frequências variadas nas populações estudadas. Estudos epidemiológicos realizados em humanos e em algumas espécies animais, como suínos e animais mantidos em cativeiro, sugerem o caráter oportunista das infecções pelo PBV em condições de imunossupressão fisiológica ou induzida (MALIK et al., 2014).

Desde a primeira descrição do PBV em amostras fecais de crianças (PEREIRA et al., 1988), o vírus já foi detectado em uma ampla gama de hospedeiros, incluindo mamíferos terrestres e marinhos, aves e répteis, bem como em águas residuais (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014). Na espécie ovina, há apenas um relato de detecção do PBV em um único cordeiro com diarreia na Espanha (MUNOZ et al., 1996).

Considerando a ampla gama de hospedeiros, a alta variabilidade genética e a escassez de estudos envolvendo PBV na espécie ovina, o objetivo desse estudo foi investigar a frequência de ocorrência do PBV e a distribuição da infecção em uma propriedade de criação de ovinos localizada no município de Toledo, Paraná. Este

trabalho constitui-se no primeiro relato de caracterização molecular de isolados de PBV em hospedeiro ovino no mundo.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

**Localização e descrição do local de estudo:** O estudo foi realizado em uma propriedade de criação de ovinos com aptidão para corte, localizada no município de Toledo, mesorregião Oeste do estado do Paraná, nas coordenadas geográficas 24°42'51.736"S e 53°42'16.79"W. O plantel com aproximadamente 1.300 animais, é predominantemente formado por ovinos oriundos do cruzamento entre as raças Dorper e Santa Inês. O sistema de criação é em regime de pasto, sendo os animais recolhidos em baias para receber a suplementação energético-proteica. Os animais são mantidos em baias coletivas de alvenaria com piso de cimento forrado com cama de maravalha. Os lotes em cada baia variam de acordo com a categoria animal (matrizes, cordeiros, cordeiros recém desmamados, reprodutores, animais de descarte e borregas) (Apêndice D). A baia dos cordeiros alojam animais com diferentes idades variando entre 1 a 12 semanas de vida, além de alojar suas respectivas matrizes. A baia de animais descarte corresponde aos ovinos com baixa condição corporal ou com sinais de doença crônica debilitante.

**Amostras de fezes:** A coleta de amostras foi realizada em duas datas distintas. A primeira coleta, realizada em maio de 2016, compreendeu 33 amostras de fezes de cordeiros que foram inicialmente avaliadas para investigar a ocorrência do PBV na espécie ovina. A segunda coleta, realizada em setembro de 2016, incluiu 67 amostras provenientes de animais de diferentes categorias. Desta forma, a distribuição das 100 amostras incluídas neste estudo, por categoria animal, foi: matrizes entre 1,5 e 2 anos de idade (n=8), cordeiros até 12 semanas (n=46), cordeiros recém-desmamados entre 12 e 16 semanas de idade (n=16), reprodutores entre 1 e 2 anos (n=10), animais de descarte entre 1 e 2,5 anos (n=10) e borregas compreendendo fêmeas entre 36 semanas a 1,5 anos de idade (n=10). As amostras foram coletadas diretamente da ampola retal e foram classificadas quanto à consistência em líquidas a pastosas (n=13) ou sólidas (n=87). 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.

**Extração bruta das fezes:** As amostras foram diluídas em tampão pH 7,4 (Tris-HCl 0,089 mM /L, CaCl<sub>2</sub> 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 de ácido nucléico viral:** Para a extração do ácido nucléico viral foi utilizado a associação das técnicas fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/isotiocianato de guanidina, conforme descrita por Alfieri et al., (2006) com adaptações. Alíquotas de 450 µL das suspensões fecais diluídas em tampão pH 7,4 foram tratadas com sódio dodecil sulfato (SDS) 1% e mantidas em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Após, foi adicionado igual volume da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, seguidos por agitação mecânica, incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos e centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989). A fração aquosa obtida foi submetida ao tratamento com sílica e isotiocianato de guanidina, conforme descrito por Boom et al., (1990) com adaptações. Os ácidos nucleicos extraídos foram eluídos da matriz de sílica em 50 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DPEC) autoclavada e mantidos a -20°C até o momento do uso. Para a certificação e validação dos procedimentos de extração realizados, foram incluídas alíquotas de água DPEC como controle negativo e amostras de fezes previamente triadas como positivas para rotavírus A bovino (RVA) como controle positivo.

**Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA):** Os ácidos nucleicos extraídos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (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., (1988).

**RT-PCR para detecção de Picobirnavirus:** 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).

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA), inicialmente, 3 µL do dsRNA extraídos, 1 µL do *primer* PicoB25 à concentração de 20 pmol (*Invitrogen Life Technologies*) e 1 µL de água ultrapura autoclavada foram incubados a 94°C por 5 minutos. Após esse período, as amostras foram imediatamente imersas em banho de gelo por 5 minutos, seguido da adição de 7,5 µL de uma solução denominada RT-Mix contendo 1 x RT *buffer* (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM

de dietiltreitol), 0,1 mM de cada dNTP (*EasyGen*®), 120 unidades da enzima M-MLV *Reverse Transcriptase* (*Promega*) e água ultrapura autoclavada para a obtenção de um volume final de 12,5 µL. A mistura foi incubada a 37° C por 50 minutos seguida de etapa para inativação da enzima a 70° C por 15 minutos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com a adição de 12,5 µL de solução PCR-Mix contendo 1x PCR *buffer* (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCL), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de cada dNTP, 0,5 µL do *primer* PicoB25 e 1 µL do *primer* PicoB45 a 20 pmol; 2,5 unidades da enzima *Platinum Taq* DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*) e água ultrapura autoclavada para completar um volume final de 25 µL. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*MyGenie 96 Thermal Block* (*Bioneer*)) com as seguintes condições de tempo e temperatura: uma etapa 94° C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de 1 minuto a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 50°C (anelamento) e 1 minuto a 72°C (extensão). A etapa de extensão final ocorreu a 72°C por 7 minutos (TAKIUCHI et al., 2016).

**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 – Loccus*).

**Sequenciamento:** Os produtos amplificados de 22 amostras 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 isolados de diferentes espécies hospedeiras e águas residuais. A árvore filogenética foi construída com o programa MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER e TAMURA, 2016) utilizando o algoritmo *Neighbor-Joining* a partir de distâncias estimadas pelo método de Kimura 2 parâmetros. A robustez da inferência filogenética foi avaliada através do método de bootstrapping (com base em 1.000 réplicas). A amostra de referência do PBV humano GII (AF246940) foi utilizada como grupo externo (*outgroup*) para enraizamento da árvore.

### 4.3 RESULTADOS

Das 33 amostras inicialmente coletadas para investigar a infecção pelo PBV em hospedeiros ovinos, 4 (12%) revelaram-se positivas em EGPA e 20 (60,6%) por RT-PCR. Confirmada a presença do PBV, foi efetuada a segunda coleta abrangendo diferentes categorias animais (n=67) para avaliar a distribuição da infecção do PBV no rebanho. Assim, do total de 100 amostras de fezes de ovinos analisadas pela EGPA, foi detectado o genoma bissegmentado do PBV em 5% (5/100) das amostras, todas compatíveis com o perfil “*large profile*” de PBV (FIGURA 1A).

Quando as amostras foram submetidas à RT-PCR, o fragmento esperado de 201 pb do gene RdRp do PBV-GI foi amplificado em 62% (62/100) das amostras, incluindo as cinco amostras positivas pela EGPA (FIGURA 1B). A distribuição de PBV de acordo com a categoria animal e técnica diagnóstica está indicada na TABELA 1.

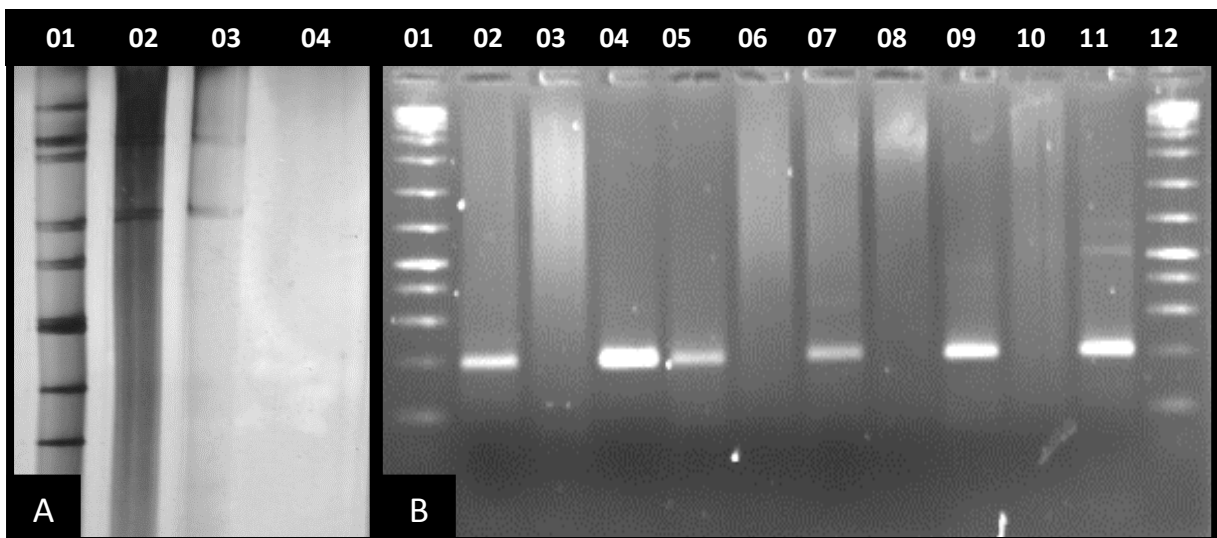
**TABELA 1** - Distribuição de amostras positivas para PBV de acordo com a categoria animal e a técnica diagnóstica utilizada.

Categoria animal	Idade	Nº amostras coletadas	Amostras PBV positivas	
			EGPA (%)	RT-PCR (%)
Cordeiros	1 - 12 semanas	46	4 (8,7%)	26 (56,5%)
Cordeiros recém desmamados	12 - 16 semanas	16	0 (0%)	9 (56,3%)
Reprodutores	1 - 2 anos	10	0 (0%)	8 (80%)
Animais descarte	1 - 2,5 anos	10	1 (10%)	7 (70%)
Borregas	36 semanas – 1,5 anos	10	0 (0%)	7 (70%)
Matrizes	1,5 - 3 anos	8	0 (0%)	5 (62,5%)
<b>Total</b>		100	5 (5%)	62 (62%)

Fonte: o autor (2017).

Das 62 amostras positivas para PBV, 11,3% (7/62) eram fezes com consistência pastosa ou diarreica e 88,7% (55/62) possuíam consistência sólida.

**FIGURA 1** - Detecção de PBV em fezes de ovinos com aptidão para corte provenientes de uma propriedade localizada no município de Toledo, Paraná. A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) seguida pela coloração por nitrato de prata. Linha 1: Perfil eletroforético de Rotavírus A bovino (controle positivo de extração e EGPA); linhas 2 e 3: amostras PBV positivas perfil “*large profile*”; linha 4: controle negativo. B) RT-PCR para amplificação de fragmento de 201 pb do gene RdRp do PBV-GI. Linhas 1 e 12: Padrão de tamanho molecular de 100 pb; Linhas 2, 4, 5, 7, 9 e 11: amostras PBV-GI positivas; Linhas 3, 6 e 8 amostras PBV-GI negativas; Linha 10: controle negativo.



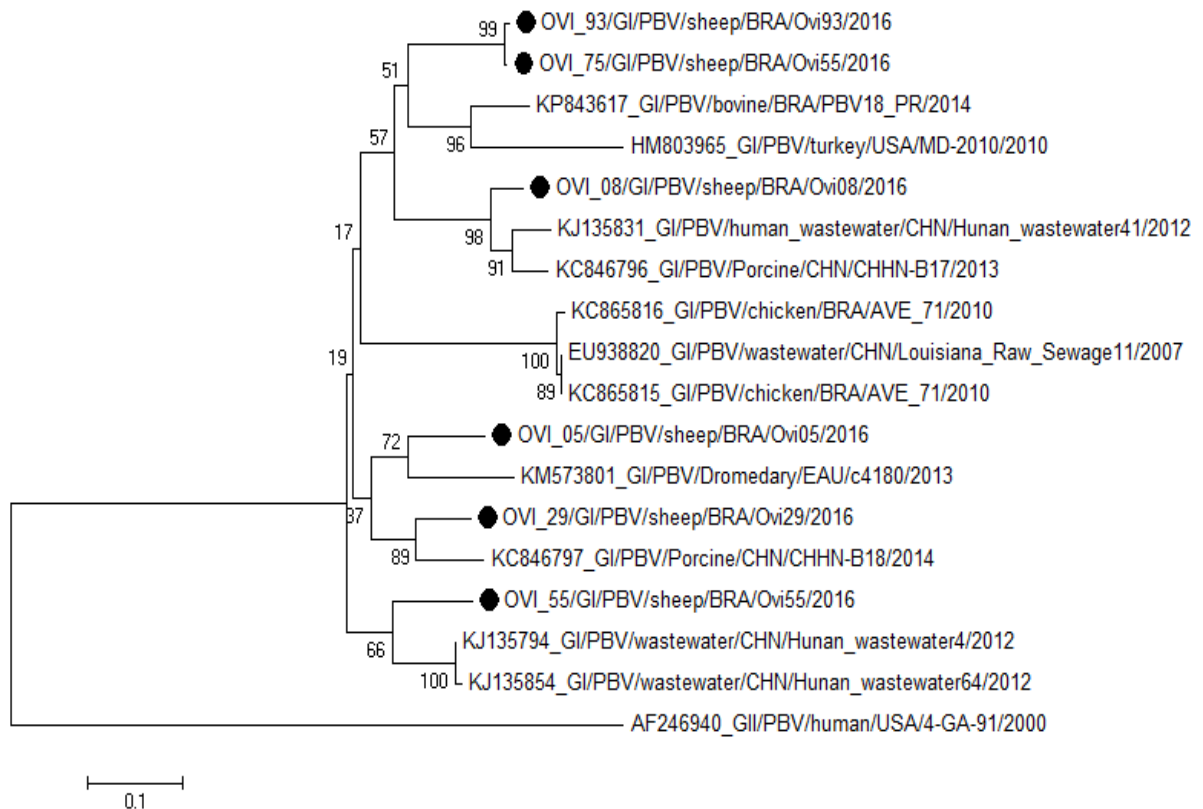
Fonte: o autor (2017).

Das 62 amostras amplificadas por RT-PCR, foram selecionadas 22 amostras que geraram banda única de 201 pb e de boa intensidade para o sequenciamento genômico. Na análise preliminar das sequências obtidas e confrontadas com outras sequências depositadas em bancos de dados públicos, foi confirmada a identidade de todos produtos amplificados como PBV-GI.

Entretanto, apenas 6 sequências apresentaram qualidade satisfatória para proceder a análise filogenética, sendo denominadas neste trabalho de OVI\_05, OVI\_08, OVI\_29, OVI\_55, OVI\_75 e OVI\_93.

Para a construção da árvore filogenética, além das sequências obtidas nesse estudo, foram utilizadas sequências de PBV provenientes de outras espécies como suínos, equinos, aves, humanos (água residual de esgoto), dromedário, leão marinho, peru e bovino. Essas sequências estão disponíveis nas bases públicas de dados e os números de acesso de cada sequência estão indicados na FIGURA 2.

**FIGURA 2** - Relação filogenética entre variantes genômicas de PBV-GI baseada em 201 nucleotídeos do gene RdRp (segmento 2). As sequências obtidas neste estudo estão indicadas pelo símbolo ●. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Neighbor-Joining*, e o modelo evolutivo *Kimura 2* parâmetros com 1000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* são indicados próximos aos nós. As barras representam unidades de substituição por nucleotídeo. A amostra AF246940, referência para o PBV-GII, foi utilizada como grupo externo (*outgroup*) para enraizamento da árvore.



Fonte: o autor (2017).

A Análise na matriz de identidade dos nucleotídeos mostrou 72-99% de identidade entre as amostras do presente estudo. Apenas as amostras OVI\_75 e OVI\_93 foram posicionadas no mesmo ramo filogenético, apresentando uma identidade de 99%, suportadas com alto valor de *bootstrap* (99%). As amostras OVI\_08 e OVI\_29 apresentaram maior identidade (91,5% e 88% respectivamente) com PBV detectado em suínos na China (KC846796 e KC846797). Já a amostra Ovi\_05 apresentou 83% de identidade com PBV de dromedário (KM573801) localizado num estudo realizados nos Emirados Árabes, enquanto a amostra OVI\_55 apresentou maior similaridade (86%) com PBV humano detectado em águas residuais

de tratamento de esgoto (KJ135794 e KJ135854). A análise da matriz de identidade para todas as amostras está apresentada no Apêndice A.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A frequência de detecção do PBV de 60,6% (20/33) nas fezes de ovinos da primeira coleta realizada, demonstrou a alta taxa de infecção em cordeiros de um rebanho ovino com aptidão para corte. Embora o PBV já tenha sido detectado em uma ampla gama de hospedeiros suscetíveis, há apenas um relato de detecção do vírus em um único hospedeiro ovino no mundo (MUNOZ et al., 1996). No referido estudo, o genoma do PBV foi detectado nas fezes diarreicas de um único animal entre os 226 cordeiros testados. Dessa forma, considerando a escassez de dados epidemiológicos nesta espécie, a segunda coleta deste estudo foi realizada para avaliar a distribuição da infecção no rebanho, incluindo diferentes categorias animais. Ficou evidente que a infecção pelo PBV estava amplamente disseminada no rebanho, sendo detectado o genoma viral em 5% (5/100) e 62% (62/100) das amostras fecais por EGPA e RT-PCR, respectivamente. Conforme demonstrado na Tabela 1, a infecção envolveu todas as categorias animais (matrizes, cordeiros, cordeiros recém-desmamados, reprodutores, borregas e animais de descarte), desde animais jovens (1 semana) até adultos (2,5 anos). De forma semelhante, outros estudos também relataram a infecção pelo PBV em suínos (CHEN et al., 2014; MARTINEZ et al., 2010); aves (MASACHESSI et al., 2012; RIBEIRO SILVA et al., 2014) e humanos (SMITS et al., 2014) em diferentes faixas etárias. Nossos resultados demonstram a alta sensibilidade da RT-PCR quando comparada à EGPA para a detecção do PBV. Em estudos que também utilizaram ambas as técnicas diagnósticas, as frequências de detecção variaram entre 4,59 a 27% com a utilização da EGPA e 11,5 a 60% com a RT-PCR, corroborando os nossos resultados (CARRUYO et al., 2008; KYLLA et al., 2017; RIBEIRO SILVA et al., 2014). Embora a baixa sensibilidade da EGPA possa ser considerado um fator limitante para o diagnóstico do PBV, a positividade nesta técnica evidencia a intensa replicação do vírus no hospedeiro, resultando na excreção do vírus em altos títulos nas fezes. Considerando um estudo realizado com o rotavírus, cujo genoma também é segmentado, o limite de detecção viral pela EGPA foi de  $10^8$  partículas por mL em fezes de crianças (KOHNO et al., 2000). Em nosso estudo, das cinco amostras positivas pela EGPA, quatro eram de cordeiros (2 a 12 semanas) e

uma proveniente de animal descarte (1,5 anos). Isso nos permite sugerir que a replicação do vírus é favorecida nos animais jovens ou com algum fator debilitante. Portanto, consideramos vantajosa a realização concomitante de EGPA e RT-PCR, ora para tentar elucidar a patogenia do PBV, ora para estimar a real prevalência da infecção.

Foi identificado apenas o perfil eletroforético “*large profile*” de PBV, concordando com outros estudos que indicam a maior frequência de detecção deste perfil por EGPA (BHATTACHARYA et al., 2006; GHOSH et al., 2009; MALIK et al., 2011; MALIK et al., 2013; TAKIUCHI et al., 2016). Além disso, as cinco amostras identificadas como PBV “*large profile*” foram amplificadas com sucesso pela RT-PCR com o par de *primers* PicoB25/PicoB43 (ROSEN et al., 2000), que são universalmente utilizados para detecção do PBV-GI em diferentes espécies hospedeiras (MALIK et al., 2014). Da mesma forma, BHATTACHARYA et al. (2006) e TAKIUCHI et al. (2016) também amplificaram apenas o PBV “*large profile*” com a este par de *primer* a partir de amostras humanas e bovinas, respectivamente.

Considerando a possível associação etiológica do PBV com os quadros de diarreia, não podemos inferir qualquer conclusão, pois a frequência de animais diarreicos no momento da coleta foi de apenas 13% (13/100). Destas amostras diarreicas, o PBV foi detectado em 53,8% (7/13). Embora não existam relatos de distribuição do PBV na espécie ovina, estudos epidemiológicos em outras espécies como humanos, suínos e bovinos apresentam resultados contraditórios. Alguns estudos descreveram a presença do vírus em fezes diarreicas (GATTI et al., 1989; KYLLA et al., 2017; SUN et al., 2016), porém, a participação do PBV como agente etiológico primário de diarreia não pode ser estabelecida uma vez que o vírus também tem sido detectado em fezes com a consistência normal (CARRUYO et al., 2008; LUDERT et al., 1991; MARTINEZ et al., 2010; TAKIUCHI et al., 2016; WILBURN et al., 2017). Porém, em nosso estudo ficou evidente a intensa replicação e excreção do PBV nas fezes de animais não diarreicos, visto que, quatro dos cinco animais positivos pela EGPA apresentaram fezes sólidas.

A história natural da infecção por PBV ainda não está totalmente elucidada, mas estudos longitudinais realizados na Argentina, sugerem que o vírus infecte seus hospedeiros nas primeiras semanas de vida, estabelecendo uma infecção persistente e assintomática, e perpetuando até a fase adulta com excreções intermitentes (MARTINEZ et al., 2010; MASACHESSI et al., 2012; MASACHESSI et al., 2015). Os

mecanismos pelos quais as infecções persistentes são mantidas envolvem tanto a modulação do vírus, como principalmente a resposta imune do hospedeiro, nos levando a acreditar que fatores como imunossupressão, estresse e condição fisiológica possam promover a maior excreção viral, fazendo com que o vírus seja classificado como um agente secundário oportunista (MASACHESSI et al., 2015).

Em humanos, tem sido atribuído ao PBV o papel de agente oportunista em indivíduos imunossuprimidos. Em pacientes infectados pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e com quadro clínico de diarreia crônica, a frequência de detecção do PBV foi significativamente maior em relação ao grupo controle (BHATTACHARYA et al., 2006; GIORDANO et al., 1999; GONZALEZ et al., 1998; GROHMANN et al., 1993). Essa característica oportunista também foi observada em suínos, onde 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 (MARTINEZ et al., 2010). Além disso, também identificamos que a circulação do vírus pode estar vinculada a algumas falhas de manejo realizadas na propriedade. Entre essas falhas incluem principalmente a mistura e superlotação de animais de diferentes faixas etárias na mesma baia, e também apresentar uma rotatividade de animais muito grande. Todos esses fatores já foram evidenciados como fatores de risco para outros vírus entéricos como o rotavírus (FREITAS et al., 2011).

Levando em consideração a análise filogenética, 22 amostras previamente positivas pela RT-PR para GI foram encaminhadas para sequenciamento genético. Na análise inicial, comparando essas sequências com outras já depositadas em bancos públicos de dados, foi possível a confirmação de que essas sequências pertenciam ao gene RdRp do segmento 2 de PBV identificando o PBV-GI. Porém, apenas seis sequências (OVI\_05, OVI\_08, OVI\_29, OVI\_55, OVI\_75 e OVI\_93) foram selecionadas por apresentar um valor mínimo de 20 para todas as bases nucleotídicas na avaliação do eletroferograma, e prosseguir com a análise filogenética.

Devido à escassez de trabalhos com PBV realizados na espécie ovina, a análise filogenética foi realizada comparando as sequências adquiridas nesse trabalho com as sequências obtidas de PBV de outras espécies. A construção da árvore filogenética mostrou a formação de alguns grupos, mas não obedeceram a um padrão de distribuição ou agrupamento de espécies. A identidade nucleotídica entre os isolados de PBV ovino avaliados neste estudo, variou de 72,6% a 99%. Quando

comparados com outras sequências de PBV de diferentes origens, a identidade de nucleotídeos variou entre 67,1 a 91,5%. (Apêndice A).

Apenas os isolados OVI\_75 e OVI\_93 foram agrupados no mesmo ramo filogenético, apresentando 99% de identidade entre si. Curiosamente, as demais sequências apresentaram uma maior identidade com espécies heterólogas. As amostras OVI\_08 e OVI\_29 demonstraram 91,5% e 88% de identidade nucleotídica com PBV isolados de suínos na China, respectivamente. Já a amostra OVI\_05 mostrou maior identidade (83%) com um PBV detectado em um dromedário, localizado nos Emirados Árabes, enquanto a amostra OVI\_55 ficou próxima de uma sequência de PBV humano proveniente de água residual de esgoto na China, com 86% de identidade. Os altos valores de *bootstrap* e a inclusão de uma sequência de PBV-GII como *outgroup* suportam a inferência filogenética (FIGURA 2). Além disso, foi inserida nesta análise, a sequência de um isolado brasileiro de PBV bovino (KP843617 GI/PBV/bovine/BRA/PBV18\_PR/2014) recentemente reportado pelo nosso grupo de pesquisa (TAKIUCHI et al., 2016). Naquele estudo, o PBV bovino apresentou maior identidade (81%) com PBV detectado em peru (HM803965 GI/PBV/turkey/USA /MD-2010/2008). A repetição do resultado na atual análise e com alto valor de *bootstrap* (98) corrobora a robustez dos ramos filogenéticos. Vale ressaltar que o isolado de PBV bovino apresentou 80% de identidade de nucleotídeos com a amostra OVI\_75.

A árvore filogenética demonstrou a alta diversidade genética entre PBV isolados de ovinos provenientes do mesmo rebanho. Entretanto, a homologia observada entre PBV de espécies heterólogas, sugere a possibilidade de transmissão inter-espécie conforme já foi mencionado por outros autores (BANYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009). Análises anteriores realizadas em amostras de humanos na Índia foram alinhadas com estirpes de PBV suínos isolados na Hungria, apresentando 85-92% de identidade para nucleotídeos (GANESH et al., 2010). Da mesma forma, um PBV detectado em equino revelou mais de 98% de identidade para nucleotídeos com uma amostra de PBV humano, também na Índia (GANESH et al., 2011). Essas informações sugerem a possibilidade de transmissão interespecie e o potencial zoonótico desse vírus (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

A heterogeneidade das sequências de PBV isoladas de uma mesma propriedade pode ser explicada pelo tipo de material genético deste vírus. Por se tratar

de um vírus RNA com genoma bissegmentado, é possível a ocorrência de mutações por reassortimento (*antigenic shift*) em casos de co-infecções. Essas mutações já foram evidenciadas em PBV isolado de lobo, que apresentou o segmento 1 com maior homologia para PBV suíno, e o segmento 2 (RdRp) com maior homologia para PBV de dromedário (CONCEICAO-NETO et al., 2016). Esse é um dado extremamente importante, considerando que pode afetar possíveis mudanças no comportamento do vírus.

#### 4.5 CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que a infecção pelo PBV está amplamente distribuída em hospedeiros ovinos de diferentes categorias numa mesma propriedade. Esse é o segundo relato de ocorrência de PBV na espécie ovina e o primeiro estudo de caracterização molecular de PBV genogrupo I neste hospedeiro no mundo. Diante da escassez de informações envolvendo a espécie ovina, fica evidente a necessidade de novas pesquisas para elucidar a participação do PBV como um agente oportunista, bem como para avaliar seu potencial zoonótico e de transmissão interespecie.

## 4.6 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.
- 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.; SAHA, D. R.; SUR, D.; NAIK, T. N.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHNAN, T. Molecular epidemiology of human picobirnaviruses among children of a slum community in Kolkata, India. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 6, n. 6, p. 453-458, 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.
- 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.
- 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.
- DELMAS, B. Family Picobirnaviridae. **Proceedings of the Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 535-539, 2011.
- 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.
- FREITAS, P.; UYEMURA, S.; SILVA, D.; SAMARA, S. I.; BUZINARO, M. D. G. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 4, p. 820-827, 2011.

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.

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

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.

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

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.

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, n. 4, 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.

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.

- 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.
- KYLLA, H.; DUTTA, T. K.; ROYCHOUHDURY, 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.
- 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.; CHANDRASHEKAR, K. M.; SHARMA, K.; HAQ, A. A.; VAID, N.; CHAKRAVARTI, S.; BATRA, M.; SINGH, R.; PANDEY, A. B. Picobirnavirus detection in bovine and buffalo calves from foothills of Himalaya and Central India. **Tropical animal health and production**, v. 43, n. 8, p. 1475-1478, 2011.
- MALIK, Y. S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; SHARMA, A. K.; SIRCAR, S.; JEENA, L. M.; SINGH, N. K.; MONDAL, A.; JOARDAR, S. N.; BALASUBRAMANIAN, G. Molecular characterization of a genetically diverse bubaline picobirnavirus strain, India. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 4, p. 609, 2013.
- 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.
- 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.
- MUNOZ, M.; ALVAREZ, M.; LANZA, I.; CARMENES, P. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. **Epidemiology and infection**, v. 117, n. 1, p. 203-211, 1996.

- 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.
- 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.
- 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.; 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.; GALLEGO, 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.
- 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 of virology**, v. 162, n. 4, p. 1061-1066, 2017.

## 5 CONCLUSÃO GERAL

1. A infecção pelo *Picobirnavirus* (PBV) em hospedeiros ovinos está amplamente disseminada no rebanho com aptidão para corte localizado no município de Toledo, Paraná;
2. O perfil “*large profile*” e PBV genogrupo I (PBV-GI) foram identificados nas fezes de animais naturalmente infectados pela eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e pela RT-PCR e sequenciamento, respectivamente;
3. Ovinos de todas as idades e categorias (cordeiros, matrizes, borregas, reprodutores, cordeiros recém desmamados e animais descarte) foram suscetíveis à infecção pelo PBV, com frequências variando entre 56,3 a 80%;
4. A excreção do PBV nas fezes ocorreu em ovinos assintomáticos e sintomáticos, porém, a maior excreção viral foi observada nos animais jovens;
5. A análise filogenética demonstrou a proximidade dos PBVs detectados em ovinos com isolados de PBV de suínos, dromedário e efluentes de águas residuais de estações de tratamento;

Este é o segundo relato de ocorrência de PBV em hospedeiro ovino e o primeiro relato de caracterização molecular de isolados de PBV nesta espécie no mundo.

## REFERÊNCIAS

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.

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.

ANTHONY, S. J.; ISLAM, A.; JOHNSON, C.; NAVARRETE-MACIAS, I.; LIANG, E.; JAIN, K.; HITCHENS, P. L.; CHE, X.; SOLOYVOV, A.; HICKS, A. L.; OJEDA-FLORES, R.; ZAMBRANA-TORRELIO, C.; ULRICH, W.; ROSTAL, M. K.; PETROSOV, A.; GARCIA, J.; HAIDER, N.; WOLFE, N.; GOLDSTEIN, T.; MORSE, S. S.; RAHMAN, M.; EPSTEIN, J. H.; MAZET, J. K.; DASZAK, P.; LIPKIN, W. I. Non-random patterns in viral diversity. **Nature communications**, v. 6, p. 8147, 2015.

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.

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.; SAHA, D. R.; SUR, D.; NAIK, T. N.; BHATTACHARYA, S. K.; KRISHNAN, T. Molecular epidemiology of human picobirnaviruses among children of a slum community in Kolkata, India. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 6, n. 6, p. 453-458, 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, 2007.

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.

BODEWES, R.; RUIZ-GONZALEZ, A.; SCHAPENDONK, C. M.; VAN DEN BRAND, J. M.; OSTERHAUS, A. D.; SMITS, S. L. Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. **Virology journal**, v. 11, p. 89, 2014.

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.

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

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.

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.

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.

COSTA, A.; CUBEL GARCIA, R.; LABARTHE, N.; LEITE, J. Detection of double-stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 554-557, 2004.

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

DELMAS, B. Family Picobirnaviridae. **Proceedings of the Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 535-539, 2011.

FINKBEINER, S. R.; ALLRED, A. F.; TARR, P. I.; KLEIN, E. J.; KIRKWOOD, C. D.; WANG, D. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. 1-9, 2008.

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.

FREITAS, P.; UYEMURA, S.; SILVA, D.; SAMARA, S. I.; BUZINARO, M. D. G. Rotavírus bovino: fatores de risco, prevalência e caracterização antigênica de amostras em rebanhos leiteiros no estado de São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 4, p. 820-827, 2011.

GALLIMORE, C.; LEWIS, D.; BROWN, D. Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. **Archives of virology**, v. 133, n. 1-2, p. 63-73, 1993.

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.; 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.

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

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.

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

GILLMAN, L.; SANCHEZ, A. M.; ARBIZA, J. Picobirnavirus in captive animals from Uruguay: identification of new hosts. **Intervirology**, v. 56, n. 1, p. 46-49, 2013.

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.; 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.; 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.

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.

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, n. 4, p. 288-292, 1998.

GREEN, J.; GALLIMORE, C.; CLEWLEY, J.; BROWN, D. Genomic characterisation of the large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobirnavirus of *Cryptosporidium parvum*. **Archives of virology**, v. 144, n. 12, p. 2457-2465, 1999.

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.

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.

KATTOOR, J.; SIRCAR, S.; SAURAB, S.; SUBRAMANIYAN, S.; DHAMA, K.; MALIK, Y. Picobirnavirus: A putative emerging threat to humans and animals. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 6, p. 327-331, 2016.

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.

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.

KYLLA, H.; DUTTA, T. K.; ROYCHOUHDURY, 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.

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

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.

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.

LUDERT, J. E.; ABDUL-LATIFF, L.; LIPRANDI, A.; LIPRANDI, F. Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double stranded RNA, in rabbit faeces. **Research in veterinary science**, v. 59, n. 3, p. 222-225, 1995.

MALIK, Y. S.; CHANDRASHEKAR, K. M.; SHARMA, K.; HAQ, A. A.; VAID, N.; CHAKRAVARTI, S.; BATRA, M.; SINGH, R.; PANDEY, A. B. Picobirnavirus detection in bovine and buffalo calves from foothills of Himalaya and Central India. **Tropical animal health and production**, v. 43, n. 8, p. 1475-1478, 2011.

MALIK, Y. S.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; SHARMA, A. K.; SIRCAR, S.; JEENA, L. M.; SINGH, N. K.; MONDAL, A.; JOARDAR, S. N.; BALASUBRAMANIAN, G. Molecular characterization of a genetically diverse bubaline picobirnavirus strain, India. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 4, p. 609, 2013.

- 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.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, B. M.; FERREYRA, L.; VILLAREAL, D.; CARELLO, M.; ASIS, C.; NATES, S. V. Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. **Archives of virology**, v. 152, n. 5, p. 989-998, 2007.
- 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.
- 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.
- MUNOZ, M.; ALVAREZ, M.; LANZA, I.; CARMENES, P. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. **Epidemiology and infection**, v. 117, n. 1, p. 203-211, 1996.
- 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.
- NG, T. F.; MESQUITA, J. R.; NASCIMENTO, M. S.; KONDOV, N. O.; WONG, W.; REUTER, G.; KNOWLES, N. J.; VEGA, E.; ESONA, M. D.; DENG, X.; VINJE, J.; DELWART, E. Feline fecal virome reveals novel and prevalent enteric viruses. **Veterinary microbiology**, v. 171, n. 1-2, p. 102-111, 2014.
- 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.

- 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.; 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.
- 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.; YI, M.; TIAN, H.; SHAO, C.; YANG, S.; HAN, J.; WANG, X.; WANG, Y.; SHEN, Q.; WANG, H.; SHAO, S.; YANG, Y.; ZHANG, W. A novel human enterovirus recombinant from a child with diarrhea. **Archives of virology**, v. 159, n. 2, p. 333-337, 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.
- SYMONDS, E. M.; GRIFFIN, D. W.; BREITBART, M. Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 5, p. 1402-1409, 2009.
- TAKIUCHI, E.; MACEDO, R.; KUNZ, A. F.; GALLEGO, 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.

VANOPDENBOSCH, E.; WELLEMAN, G. Birna-type virus in diarrhoeic calf faeces. **The Veterinary record**, v. 125, n. 24, p. 610, 1989.

VILLACORTA, I.; PEETERS, J. E.; VANOPDENBOSCH, E.; ARES-MAZAS, E.; THEYS, H. Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 35, n. 2, p. 283-287, 1991.

VOLOTAO, E. M.; SOARES, C. C.; ALBUQUERQUE, M. C.; DA SILVA, F. M.; CARVALHO, T. R.; MARINS, L. P.; D'OLIVEIRA, I. C.; SANTOS, N. First evidence of a trisegmented double-stranded RNA virus in canine faeces. **Veterinary journal**, v. 161, n. 2, p. 205-207, 2001.

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.; TU, X.; HUMPHREY, C.; MCCLURE, H.; JIANG, X.; QIN, C.; GLASS, R. I.; JIANG, B. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. **Journal of medical primatology**, v. 36, n. 2, p. 101-107, 2007.

WANG, Y.; BANYAI, K.; TU, X.; JIANG, B. Simian genogroup I picobirnaviruses: prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 8, p. 2779-2782, 2012.

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 of virology**, v. 162, n. 4, p. 1061-1066, 2017.

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.; BAI, R.; FENG, R.; ZHANG, H.; LIU, L. Detection and evolutionary analysis of picobirnaviruses in treated wastewater. **Microbial biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 474-482, 2015.

## APÊNDICES

**Apêndice A:** Matriz de identidade nucleotídica da região consensual das sequências de PBV geradas neste estudo, frente as demais representativas do gene RdRp do PBV-GI disponíveis em bases públicas de dados. A amostra AF246940, utilizada como *outgroup*, corresponde ao PBV-GII.

Código de acesso	OVI_05	OVI_08	OVI_29	OVI_55	OVI_75	OVI_93	KP843617	AF246940	KC846797	KM573801	KJ135831	KJ135794	KC846796	HM803965	KJ135854	EU938820	KC865815	KC865816
OVI_05	ID	0,766	0,781	0,756	0,746	0,741	0,746	0,446	0,776	0,83	0,761	0,756	0,741	0,681	0,756	0,711	0,711	0,711
OVI_08	0,766	ID	0,751	0,741	0,796	0,791	0,761	0,413	0,711	0,721	0,9	0,756	0,915	0,716	0,756	0,701	0,701	0,701
OVI_29	0,781	0,751	ID	0,776	0,756	0,751	0,761	0,417	0,88	0,81	0,696	0,786	0,726	0,676	0,786	0,736	0,736	0,726
OVI_55	0,756	0,741	0,776	ID	0,726	0,726	0,716	0,413	0,8	0,731	0,716	0,86	0,701	0,671	0,86	0,716	0,716	0,721
OVI_75	0,746	0,796	0,756	0,726	ID	0,99	0,8	0,455	0,741	0,716	0,751	0,786	0,756	0,731	0,786	0,701	0,701	0,701
OVI_93	0,741	0,791	0,751	0,726	0,99	ID	0,796	0,455	0,741	0,711	0,756	0,796	0,761	0,736	0,796	0,696	0,696	0,696
KP843617	0,746	0,761	0,761	0,716	0,8	0,796	ID	0,45	0,741	0,726	0,711	0,741	0,741	0,81	0,741	0,726	0,726	0,711
AF246940	0,446	0,413	0,417	0,413	0,455	0,455	0,45	ID	0,413	0,408	0,446	0,417	0,431	0,427	0,413	0,422	0,422	0,422
KC846797	0,776	0,711	0,88	0,8	0,741	0,741	0,741	0,413	ID	0,791	0,701	0,791	0,716	0,676	0,781	0,711	0,711	0,701
KM573801	0,83	0,721	0,81	0,731	0,716	0,711	0,726	0,408	0,791	ID	0,716	0,746	0,716	0,661	0,746	0,716	0,716	0,706
KJ135831	0,761	0,9	0,696	0,716	0,751	0,756	0,711	0,446	0,701	0,716	ID	0,746	0,925	0,691	0,736	0,676	0,676	0,676
KJ135794	0,756	0,756	0,786	0,86	0,786	0,796	0,741	0,417	0,791	0,746	0,746	ID	0,736	0,706	0,99	0,721	0,721	0,726
KC846796	0,741	0,915	0,726	0,701	0,756	0,761	0,741	0,431	0,716	0,716	0,925	0,736	ID	0,711	0,726	0,686	0,686	0,686
HM803965	0,681	0,716	0,676	0,671	0,731	0,736	0,81	0,427	0,676	0,661	0,691	0,706	0,711	ID	0,706	0,636	0,636	0,631
KJ135854	0,756	0,756	0,786	0,86	0,786	0,796	0,741	0,413	0,781	0,746	0,736	0,99	0,726	0,706	ID	0,721	0,721	0,726
EU938820	0,711	0,701	0,736	0,716	0,701	0,696	0,726	0,422	0,711	0,716	0,676	0,721	0,686	0,636	0,721	ID	1	0,985
KC865815	0,711	0,701	0,736	0,716	0,701	0,696	0,726	0,422	0,711	0,716	0,676	0,721	0,686	0,636	0,721	1	ID	0,985
KC865816	0,711	0,701	0,726	0,721	0,701	0,696	0,711	0,422	0,701	0,706	0,676	0,726	0,686	0,631	0,726	0,985	0,985	ID

### Legenda

OVI 05: OVI\_05/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi05/2016  
 OVI 29: OVI\_29/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi29/2016  
 OVI 93: OVI\_93/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi93/2016  
 OVI 08: OVI\_08/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi08/2016  
 OVI 55: OVI\_55/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi55/2016  
 OVI 75: OVI\_75/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi55/2016  
 KP843617: GI/PBV/bovine/BRA/PBV18\_PR/2014  
 AF246940: GI/PBV/human/USA/4-GA-91/2000  
 KC846797: GI/PBV/Porcine/CHN/CHHN-B18/2014  
 KM573801: GI/PBV/Dromedary/EAU/c4180/2013  
 KJ135831: GI/PBV/human\_wastewater/CHN/Hunan\_wastewater41/2012  
 KJ135794: GI/PBV/wastewater/CHN/Hunan\_wastewater4/2012  
 KC846796: GI/PBV/Porcine/CHN/CHHN-B17/2013  
 HM803965: GI/PBV/turkey/USA/MD-2010/2010  
 KJ135854: GI/PBV/wastewater/CHN/Hunan\_wastewater64/2012  
 EU938820: GI/PBV/wastewater/CHN/Louisiana\_Raw\_Sewage11/2007  
 KC865815: GI/PBV/chicken/BRA/AVE\_71/2010  
 KC865816: GI/PBV/chicken/BRA/AVE\_71/2010

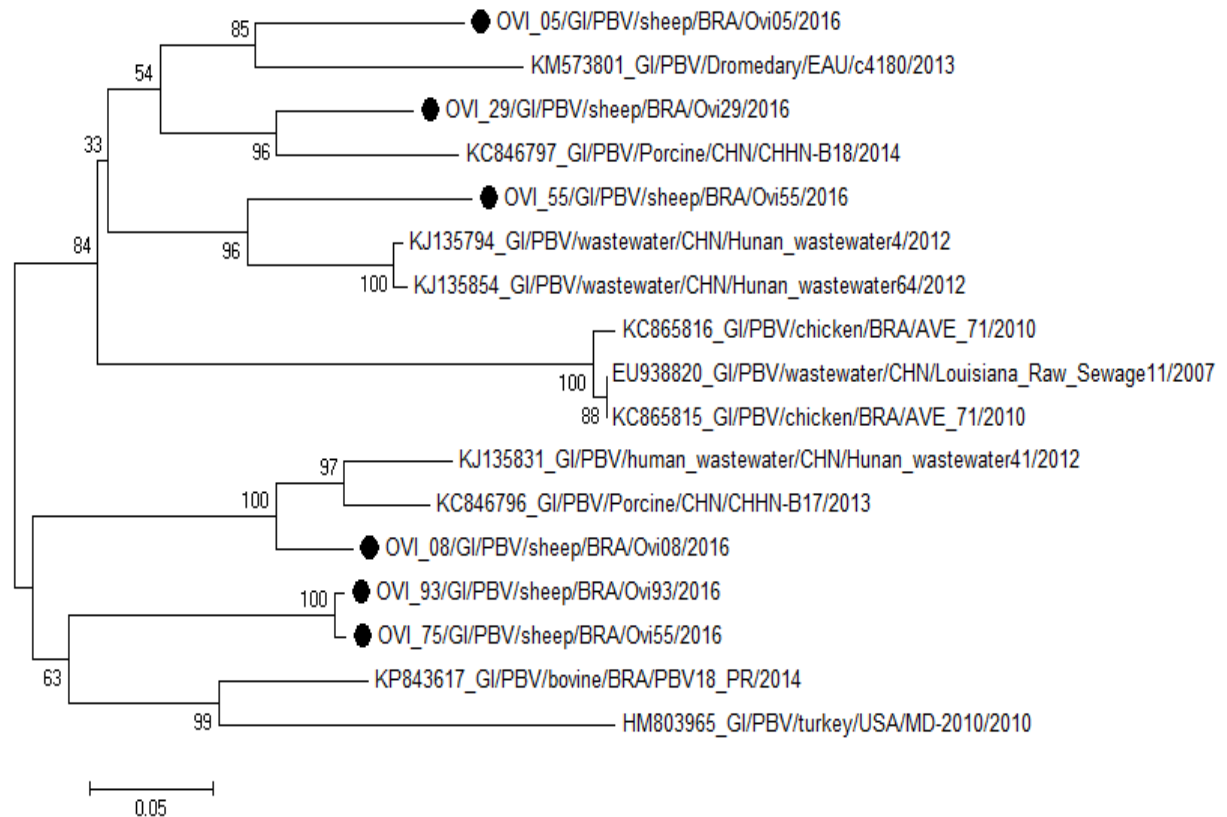
**Apêndice B: Matriz de identidade nucleotídica da região consensual das sequências de PBV geradas neste estudo, frente as demais representativas do gene RdRp do PBV-I disponíveis em bases públicas de dados.**

Código de acesso	OVI_05	OVI_08	OVI_29	OVI_55	OVI_75	OVI_93	KP843617	KC846797	KM573801	KJ135831	KJ135794	KC846796	HM803965	KJ135854	EU938820	KC865815	KC865816
OVI_05	ID	0,766	0,781	0,756	0,746	0,741	0,746	0,776	0,83	0,761	0,756	0,741	0,681	0,756	0,711	0,711	0,711
OVI_08	0,766	ID	0,751	0,741	0,796	0,791	0,761	0,711	0,721	0,9	0,756	0,915	0,716	0,756	0,701	0,701	0,701
OVI_29	0,781	0,751	ID	0,776	0,756	0,751	0,761	0,88	0,81	0,696	0,786	0,726	0,676	0,786	0,736	0,736	0,726
OVI_55	0,756	0,741	0,776	ID	0,726	0,726	0,716	0,8	0,731	0,716	0,86	0,701	0,671	0,86	0,716	0,716	0,721
OVI_75	0,746	0,796	0,756	0,726	ID	0,99	0,8	0,741	0,716	0,751	0,786	0,756	0,731	0,786	0,701	0,701	0,701
OVI_93	0,741	0,791	0,751	0,726	0,99	ID	0,796	0,741	0,711	0,756	0,796	0,761	0,736	0,796	0,696	0,696	0,696
KP843617	0,746	0,761	0,761	0,716	0,8	0,796	ID	0,741	0,726	0,711	0,741	0,741	0,81	0,741	0,726	0,726	0,711
KC846797	0,776	0,711	0,88	0,8	0,741	0,741	0,741	ID	0,791	0,701	0,791	0,716	0,676	0,781	0,711	0,711	0,701
KM573801	0,83	0,721	0,81	0,731	0,716	0,711	0,726	0,791	ID	0,716	0,746	0,716	0,661	0,746	0,716	0,716	0,706
KJ135831	0,761	0,9	0,696	0,716	0,751	0,756	0,711	0,701	0,716	ID	0,746	0,925	0,691	0,736	0,676	0,676	0,676
KJ135794	0,756	0,756	0,786	0,86	0,786	0,796	0,741	0,791	0,746	0,746	ID	0,736	0,706	0,99	0,721	0,721	0,726
KC846796	0,741	0,915	0,726	0,701	0,756	0,761	0,741	0,716	0,716	0,925	0,736	ID	0,711	0,726	0,686	0,686	0,686
HM803965	0,681	0,716	0,676	0,671	0,731	0,736	0,81	0,676	0,661	0,691	0,706	0,711	ID	0,706	0,636	0,636	0,631
KJ135854	0,756	0,756	0,786	0,86	0,786	0,796	0,741	0,781	0,746	0,736	0,99	0,726	0,706	ID	0,721	0,721	0,726
EU938820	0,711	0,701	0,736	0,716	0,701	0,696	0,726	0,711	0,716	0,676	0,721	0,686	0,636	0,721	ID	1	0,985
KC865815	0,711	0,701	0,736	0,716	0,701	0,696	0,726	0,711	0,716	0,676	0,721	0,686	0,636	0,721	1	ID	0,985
KC865816	0,711	0,701	0,726	0,721	0,701	0,696	0,711	0,701	0,706	0,676	0,726	0,686	0,631	0,726	0,985	0,985	ID

**Legenda**

- OVI 05: OVI\_05/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi05/2016
- OVI 29: OVI\_29/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi29/2016
- OVI 93: OVI\_93/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi93/2016
- OVI 08: OVI\_08/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi08/2016
- OVI 55: OVI\_55/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi55/2016
- OVI 75: OVI\_75/GI/PBV/sheep/BRA/Ovi55/2016
- KP843617: GI/PBV/bovine/BRA/PBV18\_PR/2014
- KC846797: GI/PBV/Porcine/CHN/CHHN-B18/2014
- KM573801: GI/PBV/Dromedary/EAU/c4180/2013
- KJ135831: GI/PBV/human\_wastewater/CHN/Hunan\_wastewater41/2012
- KJ135794: GI/PBV/wastewater/CHN/Hunan\_wastewater4/2012
- KC846796: GI/PBV/Porcine/CHN/CHHN-B17/2013
- HM803965: GI/PBV/turkey/USA/MD-2010/2010
- KJ135854: GI/PBV/wastewater/CHN/Hunan\_wastewater64/2012
- EU938820: GI/PBV/wastewater/CHN/Louisiana\_Raw\_Sewage11/2007
- KC865815: GI/PBV/chicken/BRA/AVE\_71/2010
- KC865816: GI/PBV/chicken/BRA/AVE\_71/2010

**Apêndice C:** Relação filogenética entre variantes genômicas de PBV-GI baseada em 201 nucleotídeos do gene RdRp (segmento 2). As sequências obtidas neste estudo estão indicadas pelo símbolo ●. A árvore filogenética foi construída utilizando o método *Neighbor-Joining*, e o modelo evolutivo *Kimura 2* parâmetros com 1000 repetições de *bootstrap*. Os valores de *bootstrap* são indicados próximos aos nós. As barras representam unidades de substituição por nucleotídeo.



**Apêndice D:** Relação das amostras de fezes de ovinos com aptidão para corte, avaliadas no período do estudo e os resultados obtidos

Identificação amostra	Categoria animal	Idade	Sexo	Características fezes	Resultado EGPA	Resultado RT-PCR	Sequenciamento	Data Coleta
OVI 01	Cordeiro	1 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 02	Cordeiro	8 sem	NI	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 03	Cordeiro	1 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 04	Cordeiro	1 sem	NI	Líquidas	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 05	Cordeiro	5 sem	NI	Normais	PBV large	<b>Positivo</b>	<b>PBV-GI<sup>1</sup></b>	05/05/2016
OVI 06	Cordeiro	2 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 07	Cordeiro	2 sem	NI	Líquidas	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 08	Cordeiro	2 sem	NI	Líquidas	PBV large	<b>Positivo</b>	<b>PBV-GI<sup>1</sup></b>	05/05/2016
OVI 09	Cordeiro	8 sem	NI	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	05/05/2016
OVI 10	Cordeiro	8 sem	NI	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	05/05/2016
OVI 11	Cordeiro	3 sem	NI	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 12	Cordeiro	8 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 13	Cordeiro	1 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 14	Cordeiro	3 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 15	Cordeiro	4 sem	M	Normais	PBV large	<b>Positivo</b>	PBV-GI	05/05/2016
OVI 16	Cordeiro	4 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 17	Cordeiro	4 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 18	Cordeiro	4 sem	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 19	Cordeiro	4 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 20	Cordeiro	4 sem	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 21	Cordeiro	10 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 22	Cordeiro	12 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 23	Cordeiro	12 sem	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 24	Cordeiro	10 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016

Identificação amostra	Categoria animal	Idade	Sexo	Característica fezes	Resultado EGPA	Resultado RT-PCR	Sequenciamento	Data Coleta
OVI 25	Cordeiro	10 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 26	Cordeiro	12 sem	M	Normais	PBV large	<b>Positivo</b>	PBV-GI	05/05/2016
OVI 27	Cordeiro	8 sem	NI	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	05/05/2016
OVI 28	Cordeiro	10 sem	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	05/05/2016
OVI 29	Cordeiro	8 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>PBV-GI<sup>1</sup></b>	05/05/2016
OVI 30	Cordeiro	1 sem	NI	Líquidas	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	05/05/2016
OVI 31	Cordeiro	8 sem	M	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 32	Cordeiro	NI	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 33	Cordeiro	NI	NI	Normais	Negativo	Negativo	NR	05/05/2016
OVI 34	Cordeiro	4 sem	F	Líquidas	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 35	Cordeiro	2 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 36	Matriz	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 37	Matriz	1,5 anos	F	Pastosas	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 38	Matriz	2 anos	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 39	Descarte	2 anos	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 40	Descarte	2,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 41	Descarte	1 ano	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 42	Descarte	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 43	Descarte	1,5 anos	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 44	Descarte	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 45	Descarte	1,5 anos	F	Normais	PBV large	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 46	Descarte	1 ano	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 47	Descarte	1 ano	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 48	Descarte	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 49	Reprodutores	2 anos	M	Pastosas	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 50	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 51	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 52	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016

Identificação amostra	Categoria animal	Idade	Sexo	Característica fezes	Resultado EGPA	Resultado RT-PCR	Sequenciamento	Data Coleta
OVI 53	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 54	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 55	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>PBV-GI<sup>1</sup></b>	26/09/2016
OVI 56	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 57	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 58	Reprodutores	1 ano	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 59	Cordeiros recém desmamados	16 sem	M	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 60	Cordeiros recém desmamados	16 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 61	Cordeiros recém desmamados	12 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 62	Cordeiros recém desmamados	12 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 63	Cordeiros recém desmamados	16 sem	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 64	Cordeiros recém desmamados	16 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 65	Cordeiros recém desmamados	12 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 66	Cordeiros recém desmamados	16 sem	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 67	Cordeiros recém desmamados	16 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 68	Cordeiros recém desmamados	16 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 69	Cordeiros recém desmamados	16 sem	M	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 70	Cordeiros recém desmamados	16 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 71	Cordeiros recém desmamados	16 sem	F	Pastosas	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 72	Cordeiros recém desmamados	12 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 73	Cordeiros recém desmamados	16 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 74	Cordeiros recém desmamados	16 sem	M	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 75	Borregas	36 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>PBV-GI<sup>1</sup></b>	26/09/2016
OVI 76	Borregas	1 ano	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 77	Borregas	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 78	Borregas	1,5 anos	F	Líquidas	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 79	Borregas	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 80	Borregas	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016

Identificação amostra	Categoria animal	Idade	Sexo	Característica fezes	Resultado EGPA	Resultado RT-PCR	Sequenciamento	Data Coleta
OVI 81	Borregas	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 82	Borregas	1,5 anos	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 83	Borregas	1,5 anos	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 84	Borregas	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 85	Cordeiro	12 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 86	Cordeiro	12 sem	M	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 87	Matriz	1,5 anos	F	Pastosas	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 88	Matriz	3 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 89	Matriz	1,5 anos	F	Pastosas	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 90	Cordeiro	8 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 91	Matriz	2 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 92	Cordeiro	12 sem	M	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 93	Cordeiro	8 sem	M	Pastosas	Negativo	<b>Positivo</b>	<b>PBV-GI<sup>1</sup></b>	26/09/2016
OVI 94	Cordeiro	12 sem	M	Líquidas	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 95	Cordeiro	12 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 96	Cordeiro	NI	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016
OVI 97	Matriz	1,5 anos	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	PBV-GI	26/09/2016
OVI 98	Cordeiro	12 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 99	Cordeiro	12 sem	F	Normais	Negativo	Negativo	NR	26/09/2016
OVI 100	Cordeiro	12 sem	F	Normais	Negativo	<b>Positivo</b>	NR	26/09/2016

**Legenda:** F: fêmea; M: macho; NI: não informado; NR: não realizado; <sup>1</sup> amostra incluída na análise filogenética

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

---

- **Hidratação da sílica**

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

- **Solução L6**

- 120 g de tiocianato de guanidina (GUSCN)
- 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 (GUSCN)
- 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) (NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH) (0,19 M)
- Água bidestilada q.s.p. 1 litro

- **Tampão estabilizador de rotavírus (TRIS/Ca<sup>++</sup> 10 x)**
  - 12,12 g TRIS (10 mM)
  - 2,2 g cloreto de cálcio (1,5 mM)
  - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 1 L
  - pH = 7,4
  
- **SDS 10%**
  - 5 g dodecilsulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S)
  - Água MilliQ autoclavada q.s.p. 50 mL
  
- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**
  - 24 mL fenol saturado
  - 24 mL clorofórmio
  - 1 mL álcool isoamílico
  
- **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 de mL 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 F:** 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<sup>++</sup> 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<sup>++</sup> 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
- **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 e/ou fotodocumentação.

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

- Gel de agarose 2% (2g de agarose para 100ml de Tampão)
- Distribuir 2 $\mu$ L de tampão amostra em Parafilm
- Padrão molecular 0,7 $\mu$ L+2 $\mu$ L de tampão amostra
- Amostras 4 $\mu$ L+ 2 $\mu$ L de tampão amostra
- Aplicar amostras nas canaletas do gel agarose
- Colocar o gel na cuba de eletroforese, coberto por tampão TRIS/Ca<sup>++</sup> 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