

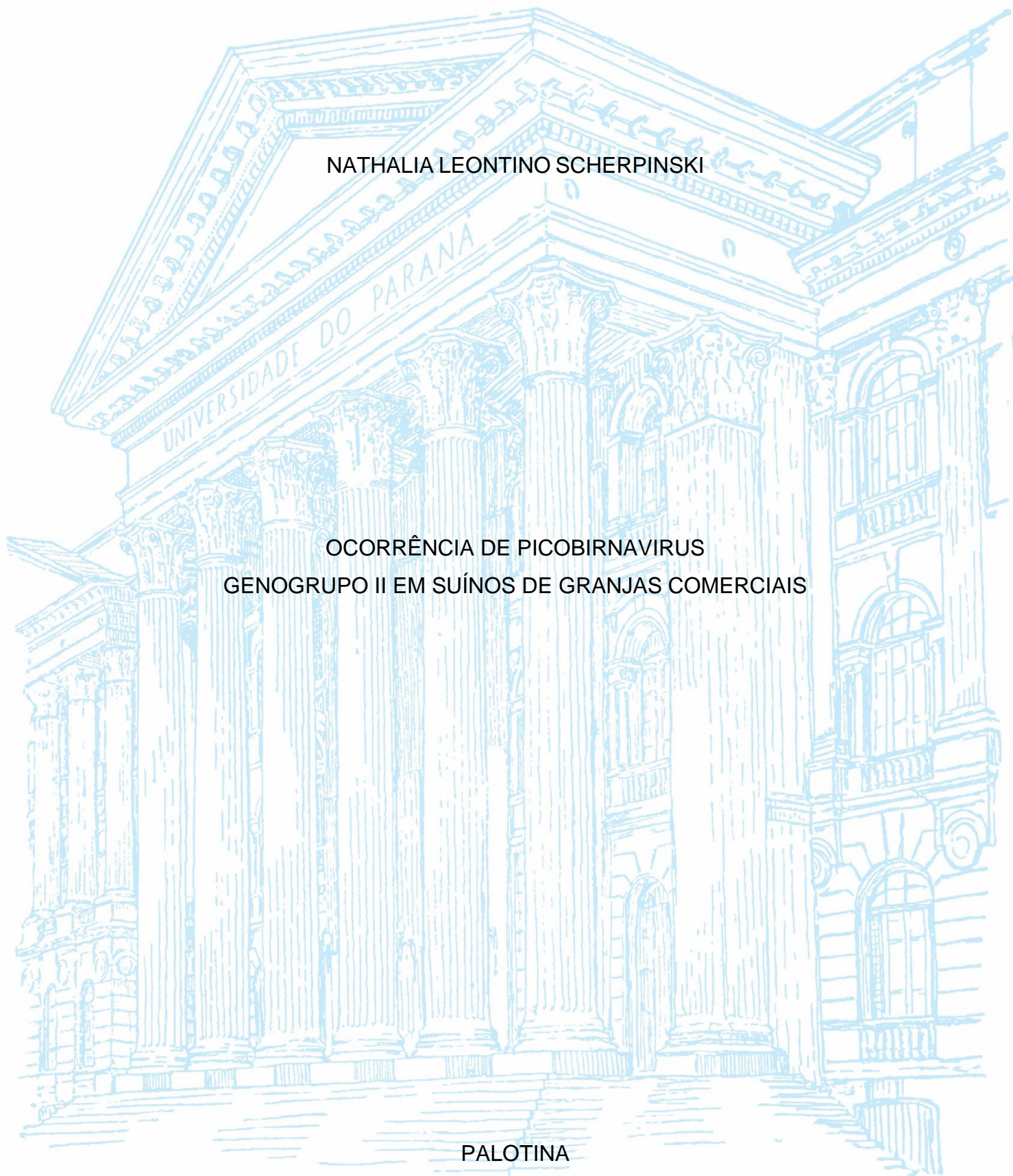
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATHALIA LEONTINO SCHERPINSKI

OCORRÊNCIA DE PICOBIRNAVIRUS
GENOGRUPO II EM SUÍNOS DE GRANJAS COMERCIAIS

PALOTINA

2021



NATHALIA LEONTINO SCHERPINSKI

OCORRÊNCIA DE PICOBIRNAVIRUS
GENOGRUPO II EM SUÍNOS DE GRANJAS COMERCIAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná como objetivo de obtenção do grau de Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elisabete Takiuchi.

PALOTINA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ATA DE REUNIÃO

Aos dezesseis dias do mês de dezembro do ano de 2021, às nove horas, na Sala virtual https://teams.microsoft.com/join/19:mme_XcXa8MlvZDvgzSZoh15BD_hSCbDkgR9LbtUbNgo1@thread.tacv2/1639655257686?context=%7B%22Tid%22:%22c37b37a3-e9e2-42f9-bc67-4b9b738e1df0%22,%22Oid%22:%2274bf949a-f481-4dff-8f9a-1fc738eab9d4%22%7D da Plataforma Teams, Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, realizou-se a Defesa Pública e Oral do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "OCORRÊNCIA DE PICOBIRNAVIRUS GENOGRUPO II EM SUÍNOS DE GRANJAS COMERCIAIS" apresentado pela discente Nathalia Leontino Scherpinski, orientada pela Profª Drª Elisabete Takiuchi, como um dos requisitos obrigatórios para conclusão do curso de graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Iniciados os trabalhos, a orientadora e Presidente da Banca concedeu a palavra à discente, para exposição do seu trabalho. A seguir, foi concedida a palavra em ordem sucessiva aos membros da Banca de Exame, os quais passaram a arguir a discente. Ultimada a defesa, que se desenvolveu nos termos normativos, a Banca de Exame, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo atribuído à discente as seguintes notas: Profª Drª Elisabete Takiuchi, nota: 95 (noventa e cinco), Profª Drª Adriana Fiorini Rosado, nota: 95 (noventa e cinco), e Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes, nota: 95 (noventa e cinco). A nota final da discente, após a média aritmética dos três membros da banca de exame, foi 95 (noventa e cinco). As considerações e sugestões feitas pela Banca de Exame deverão ser atendidas pela discente sob acompanhamento de sua orientadora. Nada mais havendo a tratar foi lavrada a presente ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.



Documento assinado eletronicamente por **ELISABETE TAKIUCHI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/12/2021, às 10:01, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **NELSON LUIS MELLO FERNANDES, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/12/2021, às 10:09, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **ADRIANA FIORINI ROSADO, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/12/2021, às 17:25, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **4135757** e o código CRC **88AC2097**.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus e ao universo por me permitir chegar até aqui cercada de boas pessoas e muitos aprendizados. A minha família que sempre me apoiou, principalmente meu pai Luis e minha mãe Vilma que me permitiram ser quem eu sou e em especial a minha irmã Nayara Leontino Scherpinski, por sempre estar ao meu lado acreditando e incentivando meus sonhos.

Aos meus amigos Thiago José Potulski e João Vinicius Soares por estarem comigo nessa experiência desde o colégio. E todos meus amigos que tornaram a fase universitária mais leve, divertida e que estiveram presentes nos bons e maus momentos, em especial Caroline Beatriz Wayhs Backes, Fernanda Neukamp, Bianca Rafaela Backes e Caroline do Nascimento Ferreira.

À orientadora, Prof.^a Dra. Elisabete Takiuchi, pelo acompanhamento e orientação durante o TCC e os projetos de iniciação científica. Prof. Dr. Nelson Luis Mello Fernandes por todas as oportunidades, que me fizeram crescer e aprender. Aos Professores do Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, por todo conhecimento compartilhado.

À Joice Andrade, pela parceria no ambiente de trabalho, sempre me auxiliando na resolução de problemas e estando presente em todos os momentos. Ao Igor Mattiuzzi pela parceria durante todo esse processo acadêmico.

RESUMO

Os *Picobirnavirus* (PBV) são considerados vírus emergentes pertencentes à família *Picobirnaviridae*. Possui genoma de RNA fita dupla bissegmentado (dsRNA), envolvido por um capsídeo icosaédrico e não-envelopado. Os PBV infectam uma ampla gama de hospedeiros e são atualmente classificados em dois genogrupos (GI e GII) com base na variabilidade genética do segmento 2 (gene RdRp – gene da RNA Polimerase dependente de RNA) do RNA. A patogenia envolvendo o PBV é ainda controversa, mas já foi evidenciada maior excreção do vírus em humanos imunossuprimidos e animais sob estresse fisiológico ou induzido. No entanto, quando comparado ao GI, os estudos epidemiológicos envolvendo o PBV GII em suínos são muito escassos, sendo ainda inexistentes no Brasil. O presente trabalho teve como objetivo investigar a ocorrência de PBV GII em suínos provenientes de cinco granjas comerciais da região oeste do Paraná, pela técnica RT-PCR. Em todas as granjas houve a detecção de pelo menos um animal positivo. Das 53 amostras de fezes analisadas, 14 (26,4%) revelaram-se positivas, com a amplificação de um fragmento com o tamanho esperado de 369 bp. A frequência de detecção observada indica que o PBV GII está presente nas granjas comerciais de suínos da região oeste do Paraná. Entretanto, esses resultados são preliminares e ainda não possibilita fazer qualquer inferência sobre o papel etiológico do PBV no hospedeiro suíno.

Palavras-chave: *Picobirnavirus*, suíno, genogrupo II.

ABSTRACT

Picobirnavirus (PBV) are considered emerging viruses belonging to the *Picobirnaviridae* family. It has a double-stranded bisegmented RNA genome (dsRNA), surrounded by an icosahedral and non-enveloped capsid. PBV infect a wide range of hosts and are currently classified into two genogroups (GI and GII) based on the genetic variability of segment 2 (RdRp gene - RNA Polymerase gene dependent on RNA) of RNA. The pathogenesis involving PBV is still controversial, but greater excretion of the virus has been shown in immunosuppressed humans and animals under physiological or induced stress. However, when compared to GI, epidemiological studies involving PBV GII in swine are very scarce, being still non-existent in Brazil. This study aimed to investigate the occurrence of PBV GII in swine from five commercial farms in western Paraná by the RT-PCR technique. In all farms, at least one positive animal was detected. Of the 53 stool samples analyzed, 14 (26.4%) were positive, with the amplification of a fragment with the expected size of 369 bp. The observed detection frequency indicates that PBV GII is present in commercial swine farms in the western region of Paraná. However, these results are preliminary and still do not allow us to make any inferences about the etiological role of PBV in the swine host.

Keywords: *Picobirnavirus*, swine, genogroup II.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VÍRION DE PBV..... 12
- FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DE PBV BASEADO NA SEQUÊNCIA COMPLETA DE PBV EM HOSPEDEIROS HUMANO...13
- FIGURA 3 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA. IMAGEM A – LINHA 1: PADRÃO DE MIGRAÇÃO ROTAVÍRUS BOVINO, LINHA 2: AMOSTRA NEGATIVA, LINHA 3: PERFIL ELETROFORÉTICO *LARGE* DO PBV. IMAGEM B – LINHA 1: PADRÃO DE MIGRAÇÃO ROTAVÍRUS BOVINO, LINHA 2: AMOSTRA NEGATIVA, LINHA 3: AMOSTRA NEGATIVA, LINHA 4: PERFIL ELETROFORÉTICO *SMALL* DO PBV. 16
- FIGURA 4 - RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO 369 PB DO GENE RDRP DO PBV-GII. CANALETA 01: PADRÃO DE TAMANHO MOLECULAR DE 100PB; CANALETAS 02 E 03: AMOSTRAS FECAIS DE SUÍNOS PBV GII POSITIVAS.....22

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 1 – SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE GENOGRUPOS DE PBV POR RT-PCR..... | 16 |
| TABELA 2 - ESTUDOS DE DETECÇÃO DE PBV EM SUÍNOS, DE ACORDO COM A LOCALIDADE, MÉTODO DIAGNÓSTICO E TIPO DE AMOSTRA..... | 18 |
| TABELA 3 - QUANTIDADE DE AMOSTRAS TESTADAS E POSITIVAS DISTRIBUÍDAS POR GRANJA..... | 21 |
| TABELA 4 - CATEGORIA E N° DE ANIMAIS POSITIVOS PARA PDV-GII..... | 22 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 9 |
| 2. OBJETIVOS | 10 |
| 2.1. Objetivo Geral | 10 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 10 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 11 |
| 4. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 12 |
| 4.1. <i>Picobirnavirus (PBV)</i> | 12 |
| 4.2. Diagnóstico molecular de <i>Picobirnavirus</i> | 15 |
| 4.3. <i>Picobirnavirus</i> em suínos | 17 |
| 5. METODOLOGIA | 19 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 24 |
| REFERÊNCIAS | 25 |

1. INTRODUÇÃO

Várias doenças infecciosas em suínos podem diminuir a produtividade e afetar o bem-estar animal; dentre essas doenças, muitas são de etiologia viral cujo papel patogênico é conhecido. Entretanto, também há relatos de vírus que infectam os suínos que ainda é pouco esclarecido o potencial patogênico, como o *Picobirnavirus* (PBV), por exemplo.

O PBV é considerado um vírus emergente, não envelopado, com genoma RNA bissegmentado de cadeia dupla, podendo ser classificado em genogrupo I (GI) ou II (GII) frente à variabilidade genética do segmento 2 (gene RdRp) do RNA.

O PBV tem sido detectado em fezes diarreicas de diferentes espécies animais. No entanto, sua participação como agente etiológico primário da diarreia ainda é inconclusiva, pois muitos trabalhos também já reportaram a excreção do vírus em animais assintomáticos. Além disso, é considerado um vírus oportunista pois já foi descrito em pacientes humanos imunocomprometidos (GÓNZALEZ, et al., 1998; VALLE et al., 2001).

Na espécie suína o PBV já foi detectado nos animais sob estresse fisiológico ou induzido, tais como animais em confinamento, período de lactação, desmame, animais com diarreia e até mesmo em animais assintomáticos (MARTINEZ et. al., 2010; WILBURN et al., 2017). No entanto, no Brasil, existem poucos estudos de PBV envolvendo a espécie suína e os dois únicos relatos envolvem o PBV GI (FREGOLENTE e GATTI, 2009; ROSADO et al., 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Investigar a ocorrência de *Picobirnavirus* genogrupo II (PBV GII) em suínos provenientes de granjas comerciais da região oeste do Paraná.

2.2. Objetivos Específicos

- Detectar, por meio da técnica RT-PCR, o PBV GII em amostras fecais de suínos;
- Avaliar a frequência de ocorrência de PBV-GII em suínos;
- Analisar a distribuição da infecção de PBV-GII em suínos de acordo com a categoria animal.

3. JUSTIFICATIVA

O Brasil é o terceiro maior produtor de suínos do mundo, pois conta com um rebanho formado por aproximadamente 41.124.233 cabeças (IBGE, 2020). O estado do Paraná contribui com 20,42% da produção nacional, sendo a região oeste do estado a representante da maior parte da produção. Dessa forma, os estudos de detecção e monitoramento de vírus emergentes que podem afetar a sanidade do rebanho são fundamentais para fortalecer a cadeia produtiva e zelar pelo bem-estar animal.

A pesquisa tem o intuito de contribuir na elucidação dos aspectos epidemiológicos e patogênicos do PBV na espécie suína, o que permanece inconclusivo. Baseando-se em estudos preliminares realizados em diversas espécies hospedeiras, observa-se o caráter oportunista do PBV. Entender a relação do PBV com o hospedeiro poderá se tornar um indicador da saúde animal. Além disso, são escassos os conhecimentos a respeito da patogênese, epidemiologia e características moleculares do PBV na literatura mundial, sendo fundamental a realização de novos estudos para substanciar essas informações.

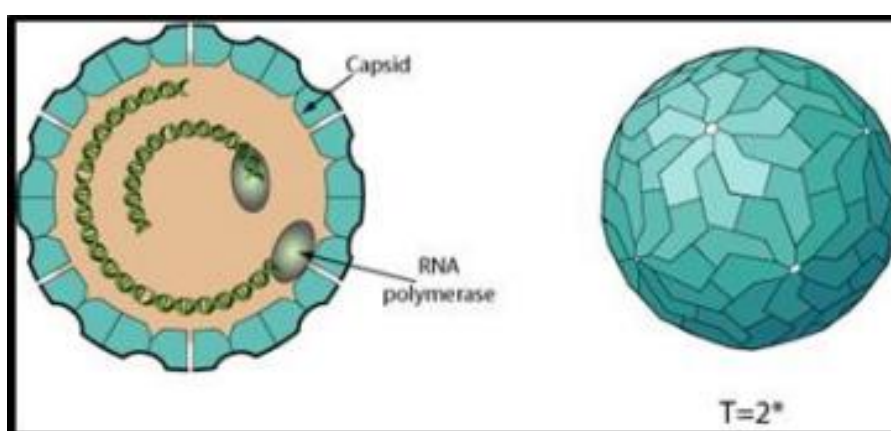
4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. *Picobirnavirus (PBV)*

O *Picobirnavirus* (PBV) constitui um único gênero da família *Picobirnaviridae* e possui três espécies reconhecidas pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV): *Beihai picobirnavirus*, *Equine picobirnavirus* e *Human picobirnavirus*. Sua nomenclatura é baseada nas características estruturais, onde “pico” é referente ao pequeno tamanho do virion, de aproximadamente 33-37 nm e o termo “birna” está relacionado com o genoma viral RNA bissegmentado, denominados segmentos 1 e 2 (DELMAS et al., 2019; ICTV, 2020).

Considerado um vírus emergente, não-envelopado, tem seu capsídeo icosaédrico simples composto por 60 dímeros simétricos, o qual é ideal para proteger o genoma RNA de fita dupla bissegmentado (FIGURA 1) (DUQUERROY et al., 2009).

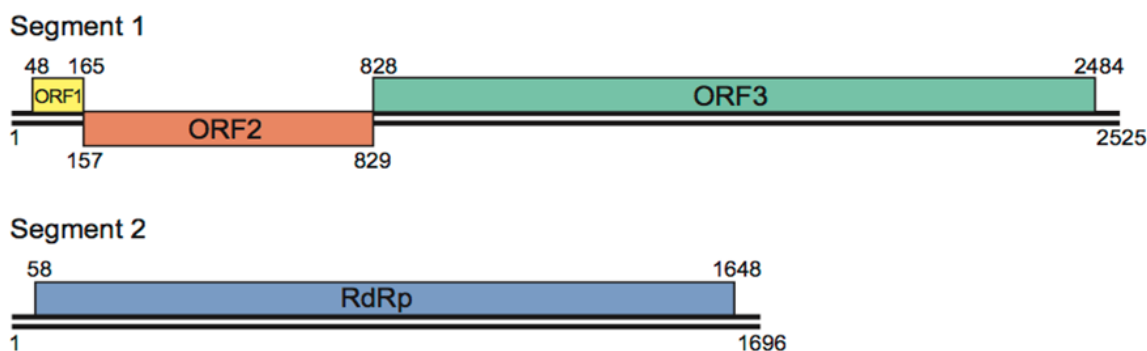
FIGURA1- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO VIRION DE PBV



FONTE: VIRAL ZONE (2017)

Até o momento são descritos apenas dois genogrupos do PBV com base na variabilidade genética do segmento 2 (gene RdRp) do vírus, genogrupo I (GI) e genogrupo II (GII) (FIGURA 2). Os estudos de frequência de ocorrência de PBV abrangem majoritariamente o GI. Apesar disso, não se pode afirmar que há uma menor circulação do GII, já que há mais *primers* descritos na literatura para amplificação de PBV GI em relação à GII. Além disso, a alta variabilidade genética demonstrada nos isolados de PBV GII também compromete a detecção molecular deste genogrupo (GANESH et al., 2012).

FIGURA 2- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ORGANIZAÇÃO DO GENOMA DE PBV BASEADO NA SEQUÊNCIA COMPLETA DE PBV EM HOSPEDEIROS HUMANO



Fonte: DELMAS, 2019

Fregolente e Gatti (2009) foram os responsáveis pela nomenclatura para a caracterização dos isolados de PBV. A proposta é constituída pela especificação do hospedeiro; país de origem abreviado em três letras; a identificação da amostra e o ano em que foi coletada. Todas as informações devem ser separadas por barras e nos casos que houver a caracterização do genogrupo, essa informação é adicionada no início da nomenclatura. Por exemplo, o isolado de um PBV em um ser humano na China em 1997, amostra 1-CHN97, caracterizada como PBV-GI, recebe a nomenclatura GI/PBV/human/CHN/1-CHN97/1997.

O sequenciamento completo dos dois segmentos foi realizado pela primeira vez com uma amostra proveniente de uma criança com gastroenterite aguda na Tailândia, o qual possibilitou a visualização da organização do genoma do PBV. O primeiro segmento de RNA (2,2 kbp) codifica três janelas de leitura aberta (ORFs), a ORF1 (39 aa) de função não elucidada; a ORF2 (224 aa) que codifica uma proteína hidrofílica de função desconhecida e a ORF3 (552 aa), codifica uma proteína de capsídeo. O segundo segmento de RNA (1,2 kbp), constituído por apenas uma ORF de 534 aminoácidos, codifica a enzima de replicação RNA Polimerase dependente de RNA (RdRp) (WAKUDA, PONGSUWANNA e TANIGUCHI, 2005; MALIK et al., 2014; DELMAS et al., 2019).

Grande parte dos estudos envolvendo o PBV e sua variabilidade genética são baseados nas sequências do segmento 2 (RdRp) do gene (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

O PBV é um vírus que tem sido detectado em humanos, animais de companhia, animais domésticos e animais silvestres. Além disso, pode ser encontrado em amostras ambientais como águas residuais e águas superficiais naturais (HAMZA, et al. 2011 e GANESH; MASACHESSI; MLADENOVA, 2014).

Alguns autores defendem a necessidade de mais estudos para estabelecer a real importância do PBV, seja como causador primário de infecções ou como agente oportunista em associação com outros patógenos, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou até mesmo como um vírus inócuo ao hospedeiro (ALFIERI, TAMEHIRO E ALFIERI, 2000; GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

Em uma província de Changsha Hunan, na China, foi detectada a presença do PBV em águas residuais de tratamento de esgoto. Os PBVs encontrados se mostraram resistentes ao tratamento, sendo inclusive apontados como bons indicadores de poluição fecal (ZHANG et al., 2014).

Giordano et al. (1999) e González et al. (1998) realizaram estudos com pacientes infectados com o vírus da imunodeficiência humana (HIV). No primeiro caso, o estudo foi um comparativo entre humanos infectados e não infectados com HIV para excreção de PBV; 15% dos pacientes portadores de HIV foram positivos para o PBV, já no grupo de não portadores, o PBV não foi detectado. No segundo caso, o estudo foi conduzido na Venezuela e detectaram a presença do PBV em pacientes infectados com o HIV.

Valle et al. (2001), em uma pesquisa realizada na Argentina, detectaram o PBV em pacientes transplantados renais. A excreção do vírus foi associada ao tratamento imunossupressor.

É importante ressaltar que nem sempre os portadores do PBV são indivíduos imunocomprometidos. Em uma pesquisa realizada na Argentina com animais de zoológico, foi possível detectar PBV em animais vivendo em cativeiros individuais e coletivos. Durante a pesquisa nenhum fator imunossupressor foi relatado; entretanto, os pesquisadores sugeriram que o estresse crônico devido ao cativeiro pode predispor os animais e favorecer a replicação e excreção viral (MASACHESSI et al., 2007).

No Brasil, em 1988, foi descrito pela primeira vez um caso de PBV detectado ocasionalmente em fezes humanas durante uma investigação de rotavírus em crianças pela técnica eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA), em que foi possível observar o genoma bissegmentado do vírus (PEREIRA et al., 1988).

Desde então, o vírus tem sido detectado em várias espécies hospedeiras em diferentes localizações geográficas pelo mundo, incluindo mamíferos terrestres

e marinhos, répteis e aves, além de águas residuais (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2016; GANESH et al., 2014; MALIK et al., 2014; NAVARRO et al., 2017).

4.2. Diagnóstico molecular de *Picobirnavírus*

A primeira técnica utilizada para identificar e detectar o PBV foi a EGPA, posteriormente a RT-PCR (Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction) e recentemente, os estudos de metagenômica têm demonstrado a presença do vírus em diversas amostras biológicas e ambientais.

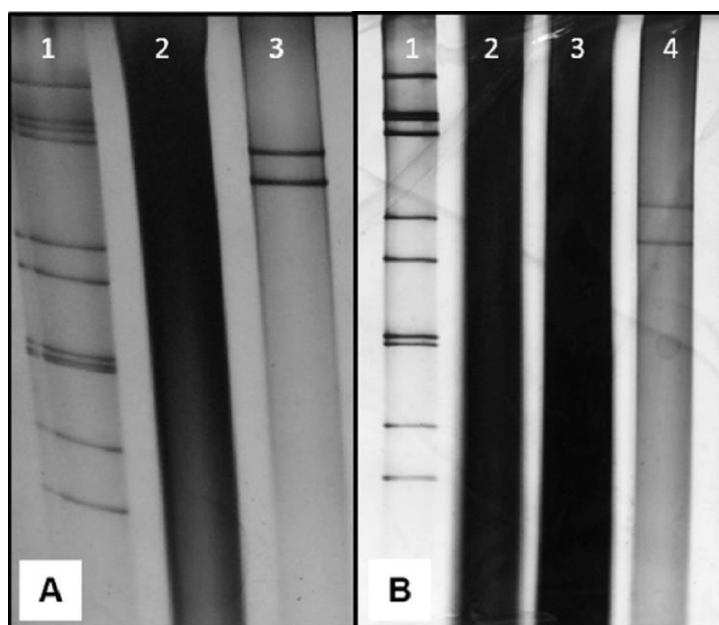
O PBV, pela característica bissegmentada do genoma viral, pode ser detectado pela EGPA seguida pela coloração com nitrato de prata. Esta técnica permite a separação dos dois fragmentos genômicos do PBV de amostras biológicas, que foram submetidas à extração de ácidos nucleicos e posteriormente à eletroforese vertical em um gel de poliacrilamida. No entanto, devido à baixa sensibilidade da técnica, apenas amostras com alta carga viral podem ser detectadas (CARRUYO et al., 2008).

O perfil de migração dos segmentos genômicos do PBV pela EGPA pode apresentar dois padrões eletroforéticos, grande (*large*) ou pequeno (*small*), os quais estão relacionados ao tamanho molecular dos fragmentos. No perfil *large* o segmento 1 apresenta 2,7 kb e o segmento 2, aproximadamente 1,9 kb. No perfil *small*, o segmento 1 tem 2,2 kb e o segmento 2, 1,2 kb (MALIK et al., 2014). Na FIGURA 3 é possível visualizar o diagnóstico do PBV por EGPA e seus perfis de migração.

A RT-PCR, além de aumentar a especificidade e sensibilidade, também permite a diferenciação dos genogrupos, análise filogenética das estirpes e caracterização genômica (FREGOLENTE et al., 2009). Entretanto, essa técnica necessita de *primers* específicos para a caracterização de cada genogrupo (GANESH, MASACHESSI e MLADENOVA, 2014).

Rosen et al. (2000) desenharam *primers* universais para a detecção de PBV GI e GII, os quais são amplamente utilizados por pesquisadores de diversos países em diferentes amostras biológicas e/ou ambientais de uma ampla gama de hospedeiros. Esses *primers* foram originalmente desenhados para amplificação parcial do gene RdRp (segmento 2) de PBV a partir de fezes de pacientes humanos (TABELA 1).

FIGURA 3 – ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA E COLORAÇÃO POR NITRATO DE PRATA. IMAGEM A – LINHA 1: PADRÃO DE MIGRAÇÃO ROTAVÍRUS BOVINO, LINHA 2: AMOSTRA NEGATIVA, LINHA 3: PERFIL ELETROFORÉTICO *LARGE* DO PBV. IMAGEM B – LINHA 1: PADRÃO DE MIGRAÇÃO ROTAVÍRUS BOVINO, LINHA 2: AMOSTRA NEGATIVA, LINHA 3: AMOSTRA NEGATIVA, LINHA 4: PERFIL ELETROFORÉTICO *SMALL* DO PBV.



Fonte: TAKIUCHI et al., 2016.

TABELA 1- SEQUÊNCIAS DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES PARA A CARACTERIZAÇÃO DE GENOGRUPOS DE PBV POR RT-PCR

| Identificação dos iniciadores | Posição (nucleotídeo) | Sequência (5'-3') | Genogrupo |
|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------|--------------|
| PicoB25 | 665-679 | TGG TGT GGA TGT TTC | Genogrupo I |
| PicoB43 | 850-865 | A(GA)T G(CT)T GGT CGA ACT T | |
| PicoB23 | 685-699 | CGG TAT GGA TGT TTC | Genogrupo II |
| PicoB24 | 1039-1053 | AAG CGA GCC CAT GTA | |

FONTE: ROSEN et al. (2000)

Atualmente, a RT-PCR é a técnica mais utilizada no diagnóstico de PBV, pois além de ser mais sensível que a EGPA (aproximadamente 100 vezes mais sensível), também permite a caracterização do genogrupo envolvido após reações de sequenciamento genômico e a realização de estudos filogenéticos (CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009).

4.3. *Picobirnavirus* em suínos

Gatti et al. (1989) descreveram o primeiro relato de PBV suíno no mundo, o qual foi detectado pela técnica EGPA em fezes diarreicas e não diarreicas, portanto, sem a caracterização molecular em GI ou GII. Em seguida, muitos estudos com suínos foram realizados no mundo, ressaltando inclusive que a infecção do PBV nesta espécie não está associada a um quadro de enterite (WILBURN et al., 2017).

Além disso, Smits et al. (2011) detectaram o PBV GI e GII em amostras de suabe nasal de suínos, ampliando o conhecimento sobre a diversidade e o tropismo deste vírus. Outro estudo descreveu a presença do PBV em fezes de suínos domésticos saudáveis de criadouros de subsistência em uma região de periferia na Índia, através de EGPA e RT-PCR (GANESH et al., 2012).

Na Tailândia a presença de PBV foi observada em 29,48% dos 308 suínos avaliados provenientes de criações comerciais (WILBURN et al., 2017).

A co-infecção com ambos os genogrupos de PBV já foram relatadas na China, Tailândia e Índia, tanto em amostras fecais como em amostras do trato respiratório de suínos (SMITIS et al., 2011; CHEN et al., 2014; WILBURN et al., 2017; KYLLA et al., 2017).

A relação entre imunossupressão e detecção de PBV em suínos de granjas comerciais também já foi relatada, sendo observado um aumento da excreção viral em períodos de estresse fisiológico, como por exemplo, período de lactação das matrizes e final de gestação. Os estudos ainda sugeriram que a infecção por PBV pode ser prolongada e intermitente no hospedeiro suíno, ocorrendo desde o seu nascimento até a fase adulta, alternando entre períodos de ausência, baixa e alta excreção, em animais assintomáticos ou não (MARTINEZ et al., 2010; MASACHESSI et al., 2015).

De acordo com a análise de nucleotídeos, o vírus pode se manter no hospedeiro com ou sem mutação, indicando assim a persistência do vírus no hospedeiro ou possível reinfecção com diferentes estirpes. Dados como esse sugerem que os animais podem permanecer assintomáticos durante toda sua vida e mesmo assim atuar como reservatório e propagador do vírus (MARTINEZ et al., 2010; MASACHESSI et al., 2015).

No entanto, no Brasil, os dois únicos estudos de caracterização molecular de PBV envolvendo a espécie suína estão relacionados ao GI (FREGOLENTE e GATTI, 2009; ROSADO et al., 2020).

Na Tabela 2 estão indicados os estudos de detecção de PBV-GII em suínos no mundo, de acordo com a técnica utilizada e a natureza da amostra biológica.

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

| Referência | País | Técnica utilizada | Amostras biológicas |
|----------------------|-------------|--------------------------|----------------------------|
| Smits et al., 2011 | China | RT-PCR | Suabe nasal/Fezes |
| Chen et al., 2014 | China | RT-PCR | Fezes |
| Wilburn et al., 2017 | Tailândia | RT-PCR | Fezes |
| Kylla et al., 2017 | Índia | EGPA / RT-PCR | Fezes |

FONTE: AUTORA (2021)

5. METODOLOGIA

Foram testadas 53 amostras de fezes de suínos, coletadas de fêmeas prenhes (n=9); lactantes (n=33); leitões (n=7); animais doentes (n=1); cachaço (n=1) e fêmeas presas em gaiolas (n=2), provenientes de cinco granjas comerciais (Granjas 6 a 10) da região oeste do Paraná. As amostras eram pertencentes à coleção de amostras biológicas do Laboratório de Virologia Animal - UFPR Setor Palotina e estavam armazenadas em coletores universais a 4 °C.

Inicialmente as amostras fecais foram aliqüotadas em microtubos para a realização da extração bruta. Este processo consistiu na diluição da amostra em solução tampão pH 7,4 (Tris-HCl 0,089 mM /L, CaCl₂ 0,15 mM/L), com concentração final de 10 a 20% (peso/volume) seguido de agitação mecânica e centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos. Por fim, 450 µL do sobrenadante foi recolhido em outro microtubo para a realização da extração de ácido nucleico.

Para a extração do ácido nucléico viral foi utilizado a associação das técnicas fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e sílica/tiocianato de guanidina, conforme descrita por Alfieri et al. (2004). Como controle negativo foi usado uma alíquota de água com dietilpirocarbonato (DEPC) e como controle positivo uma amostra fecal previamente testada e confirmada positiva para PBV GII.

Os sobrenadantes recolhidos da extração bruta foram tratados com sódio dodecil sulfato (SDS) 1% e mantidos em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Após, foi adicionado igual volume da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, homogeneização por agitação mecânica, incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos e centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos (SAMBROOK et al., 1989). O sobrenadante foi recolhido em novo microtubo sendo submetido ao tratamento com sílica e tiocianato de guanidina, conforme descrito por Boom et al. (1990). Os ácidos nucleicos extraídos foram eluídos da matriz de sílica em 50 µL de água ultrapura e mantidos a -80°C para posterior uso.

Após esse processo, o RNA extraído foi submetido à RT-PCR seguindo o protocolo descrito por Rosen et al. (2000). Foram utilizados os *primers* para amplificar um segmento de 369 pb do gene RdRp (segmento 2), específico para o GII do PBV, denominados Pico B23 (5'-CGGTATGGATGTTTC-3') e Pico B24 (5'- AAG CGA GCC CAT GTA-3'). O protocolo utilizado envolveu três etapas, (1) desnaturação, (2) transcrição reversa (RT) e (3) reação em cadeia pela polimerase (PCR), nesta sequência.

O processo para obtenção do DNA complementar (cDNA) consistiu na adição de 3 µL do RNA extraído, 1 µL do *primer* PicoB23 e 1 µL *primer* PicoB24, ambos a uma

concentração de 20 pmol/ μ L (Integrated DNA Technologies), seguido de desnaturação a 94° C por 5 minutos em termociclador. Após esse período, as amostras foram imediatamente imersas em banho de gelo por 5 minutos, seguido da adição de 7,5 μ L de uma solução denominada RT-Mix contendo 1 x RT buffer (250 mM Tris-HCl pH 8,3; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 50 mM de dietiltreitol), 0,1 mM de cada dNTP (Quatro G), 120 unidades da enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) e água ultrapura autoclavada para a obtenção de um volume final de 12,5 μ L. A mistura foi incubada a 37° C por 50 minutos seguida de etapa para inativação da enzima a 70° C por 15 minutos.

A PCR foi realizada com a adição de 12,5 μ L de solução PCR-Mix contendo 1x PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8,4; 50 mM KCl), 2 mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 0,5 μ L do *primer* PicoB24 e 0,5 μ L do *primer* PicoB23, ambos a 20 pmol/ μ L; 2,5 unidades da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies) e água ultrapura autoclavada para completar um volume final de 25 μ L. A reação de amplificação foi realizada em termociclador 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.

Os produtos amplificados foram submetidos à técnica de eletroforese em gel de agarose a 2% (Kasvi), submerso em tampão TBE pH 8,4 1x (89 mM Tris; 89 mM ácido bórico; 2 mM EDTA) em uma voltagem de 100V e 80 mA, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. Foi realizada a coloração do gel em solução contendo brometo de etídio a 0,5 μ g/mL, por aproximadamente 30 minutos, seguida da visualização dos *amplicons* em transiluminador UV.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A presença de PBV-GII foi confirmada nas fezes de suínos em todas as granjas avaliadas, tendo pelo menos um animal positivo. Das 53 amostras analisadas, 26% (14/53) resultaram positivas pela RT-PCR.

A variação da frequência de PBV GII por granja pode ser conferida na TABELA 3. A FIGURA 1 demonstra resultados positivos de PBV GII em gel de agarose, indicando o tamanho esperado de 369 pb do fragmento específico.

TABELA 3 - QUANTIDADE DE AMOSTRAS TESTADAS E POSITIVAS DISTRIBUÍDAS POR GRANJA

| Identificação da granja | Nº de amostras testadas | RT PBV-GII positivas n (%) |
|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Granja 6 | 10 | 5 (50%) |
| Granja 7 | 8 | 1 (12,5%) |
| Granja 8 | 11 | 3 (27,3%) |
| Granja 9 | 10 | 2 (20%) |
| Granja 10 | 14 | 3 (21,4%) |
| TOTAL | 53 | 14 (26,4%) |

FONTE: AUTORA (2021)

FIGURA 4 - RT-PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO FRAGMENTO DE 369 PB DO GENE RDRP DO PBV-GII. CANALETA 01: PADRÃO DE TAMANHO MOLECULAR DE 100 PB; CANALETAS 02 E 03: AMOSTRAS FECAIS DE SUÍNOS PBV GII POSITIVAS



FONTE: AUTORA (2021)

As amostras analisadas eram de fêmeas prenhes e lactantes, leitões, animais doentes e machos reprodutores. Na tabela 4 está a representação da distribuição das categorias testadas e a quantidade de animais positivos para PBV-GII.

TABELA 4 - CATEGORIA E N° DE ANIMAIS POSITIVOS PARA PDV-GII

| Categoria animal | n° de animais | RT PBV-GII positivas n (%) |
|-------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| Leitão | 7 | 3 (42,9%) |
| Fêmeas prenhes | 9 | 4 (44,4%) |
| Fêmeas lactantes | 33 | 5 (15,1%) |
| Cachaço | 1 | 1 (100%) |
| Descarte/doentes | 1 | 0 (0%) |
| Fêmea em gaiolas | 2 | 1 (50%) |
| Total | 53 | 14 (26%) |

FONTE: AUTORA (2021)

Segundo estudo realizado por Martinez et al. (2010), há um aumento de detecção de PBV ao final da gestação e durante o período de lactação em porcas, propondo assim, que as condições geradas pelo manejo animal e estresse fisiológico, podem contribuir para o aumento da replicação e excreção viral. As condições de criação dos suínos também são objeto de estudo, os quais relatam que o atual modo de criação gera estresse, podendo ser essa a relação do estado fisiológico dos animais com a excreção viral (PAVIČIĆ et al., 2003 e TUCHSCHERER et al., 2002).

A associação causal do PBV com diarreia ainda é controversa, já que a amostragem foi composta somente por fezes de suínos com consistência normal. Com isso, é possível considerar que o PBV não seja um patógeno primário da diarreia. Entretanto, vale salientar que não foram avaliados nos sistemas de criação situações imunodebilitantes como deficiência nutricional e/ou doenças concomitantes.

Segundo Wilson (1997), o insucesso na amplificação do material genético pela técnica de RT-PCR pode ocorrer devido a possível degradação do RNA viral e/ou presença de contaminantes, os quais podem atuar como inibidores das polimerases. Outro aspecto limitante é a dificuldade de amplificação do PBV-GII. Em um estudo realizado com bovinos no Brasil, atribuiu-se aos *primers* utilizados a possível falha de detecção, em função da alta variabilidade genética deste genogrupo (NAVARRO et al., 2018).

No mundo inteiro, existem poucos relatos com PBV-GII se comparados com GI, isso pode ocorrer tanto pela predominância de estudos e casos com PBV-GI, ou ainda, devido à falha de detecção pelos *primers* (GANESH., 2012).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível detectar o PBV-GII em amostras fecais de suínos, demonstrando que o vírus está presente nos sistemas de criação comerciais da região oeste do Paraná e acometendo diferentes categorias de animais. Embora este seja o primeiro estudo envolvendo PBV-GII em suínos no Brasil, esses resultados ainda são preliminares e não nos permite fazer qualquer inferência sobre o papel etiológico do PBV no hospedeiro suíno devido ao baixo número de amostras analisadas. A partir dos resultados obtidos estão sendo delineados novos estudos contemplando maior número de amostras de animais sob diferentes condições clínicas para avaliar o potencial patogênico deste vírus em suínos.

REFERÊNCIAS

ALFIERI, A. F.; TAMEHIRO, C. Y.; ALFIERI, A. A. Vírus entéricos RNA fita dupla, segmentado, em aves: Rotavírus, Reovírus e Picobrinavírus. **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v. 21, n. 1, p. 101-113, mar. 2000.

ALFIERI, A.F.; BARREIROS, M.A.B.; LEITE, J.P.G.; RICHTZENHAIN, L.J.; ALFIERI, A.A. G and P genotypes of group A rotavirus strains circulating in calves in Brazil, 1996-1999. **Veterinary Microbiology**, v.99, n.3-4, p.167-173, 2004.

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.; MARTÍNEZ, L. C.; PUJOL, F. H.; NATES, S. V.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. Molecular Characterization of Porcine Picobirnaviruses and Development a Specific Reverse Transcription-PCR Assay. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2402-2405, jul. 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.; ATTOUI, H.; GHOSH, S.; MALIK, Y. S.; MUNDT, E.; VAKHARIA, V. N.; AND ICTV REPORT CONSORTIUM. ICTV Virus Taxonomy Profile: Picobirnaviridae, **Journal of General Virology**, v. 100, p. 133–134, 2019.

DUQUERROY S, DA COSTA B, HENRY C, VIGOUROUX A, LIBERSOU S, LEPAULT J, NAVAZA J, DELMAS B, REY F. A. The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. **EMBO J**, v .28, n. 11. p.1655–16652009.

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

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

GANESH, B.; 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.

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.

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

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

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

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.

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.; BALASUBRAMANIAN, G.; MARTINEZ, L. C.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, M. B.; PAVÁN, G. V.; MATEOS, C. A.; NATES, S. V. Maintenance of picobirnavirus (PBV) infection in an adult orangutan (*Pongo pygmaeus*) and genetic diversity of excreted viral strains during a three-year period. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 29, p. 196-202, 2015.

MASACHESSI, G.; MARTINEZ, L. C.; GIORDANO, M. O.; BARRIL, P. A.; ISA, M. B.; 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.

NAVARRO, J. O.; CANDIDO, M.; ALMEIDA-QUEIROZ, S. R.; BUZINARO, M. G.; LIVONESI, M. C.; FERNANDES, A. M.; SOUSA, R. L. M. Genetic diversity of bovine Picobirnavirus, **Brazil. Virus genes**, v. 54, p. 724-728, 2018.

NATES S.V.; GATTI M. S.; LUDERT J. E.; The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential. **Future Virology**; n 6(2): p. 223-235,201.

PAVIČIĆ, Ž.; VUČEMILO, M.; TOFANT, A.; VIJTIUK, N.; POPOVIČ, M.; BALENOVIČ, T. Effect of immunostimulator Baypamum on plasma cortisol concentration in gilts regrouped during the late stacy of pregnancy. **Acta Veterinaria Brno**, v. 72, p. 509-514, 2003.

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.

ROSADO, N.C.L.; SANTOS, M.R.; SILVA, L.M.N.; ASSAO, V.S.; ARAÚJO, E.N.; GONZAGA, N.F.; KUNZ, A.F.; TAKIUCHI, E.; BRESSAN, G.C.; FIETTO, J.L.R.; SILVA-JÚNIOR A. Detection and partial molecular characterization of Picobirnavirus in swine from the state of Minas Gerais, Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 82, p. 1798-1801, 2020.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. **Cold Spring Harbor**, N.Y. 2. ed., 1989.

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

TAKIUCHI, E.; MACEDO, R.; KUNZ, A. F.; GALLEGU, J.C.; MELLO, J. L.; OTONEL, R. A. A.; ALFIERI, A. A. Eletrophoretic 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.

TUCHSCHERER, M.; KANITZ, E.; OTTEN, W.; TUCHSCHERER. A. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. **Veterinary Immunology and Immunophatology**, v. 86, p. 195-203, 2002.

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

VIRAL ZONE. Picobirnavirus. Disponível em: < <https://viralzone.expasy.org/602>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

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

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

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

ZHANG, S.; BAI, R.; FENG, R.; ZHANG, H.; LIU, L. Detection and evolutionary analyses of picobirnaviruses in treated wastewater. **Microbial Technology**, v. 8, p. 474-482, 2014.