LUIS RAMIRO LUNA ESPINOSA

**Deteccção e genotipagem de astrovírus em amostras fecais de aves de
produção procedentes de diferentes criações comerciais brasileiras**

São Paulo

2016

LUIS RAMIRO LUNA ESPINOZA

**Deteção e genotipagem de astrovírus em amostras fecais de aves de produção
procedentes de diferentes criações comerciais brasileiras**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Fabio Gregori

De acordo: _____
Orientador(a)

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3264
FMVZ

Espinoza, Luis Ramiro Luna

Detecção e genotipagem de astrovírus em amostras fecais de aves de produção procedentes de diferentes criações comerciais brasileiras / Luis Ramiro Luna Espinoza. -- 2016.
101 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Gregori.

1. Astrovírus aviário. 2. Avicultura. 3. Epidemiologia. 4. Genótipos. 5. Diversidade. I. Título.

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 20 de dezembro de 2014

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Detecção e genotipagem de Astrovírus em amostras fecais de aves de produção procedentes de diferentes criações comerciais brasileiras", protocolado sob o CEUA nº 5970241114, utilizando 100 Aves (50 machos e 50 fêmeas), sob a responsabilidade de Fabio Gregori, foi aprovado na reunião de 17/12/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Detection and genotyping of Astrovirus in fecal samples of production poultry from different Brazilian commercial farms", protocol number CEUA 5970241114, utilizing 100 Birds (50 males and 50 females), under the responsibility Fabio Gregori, was approved in the meeting of day 12/17/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LUNA ESPINOZA, Luis Ramiro

Título: Detecção e genotipagem de astrovírus em amostras fecais de aves de produção procedentes de diferentes criações comerciais brasileiras

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, pela oportunidade de continuar a crescer e cumprir um dos objetivos na procura dos meus sonhos e ideais:

A Universidade de São Paulo, pelo espaço onde estive a desenvolver não apenas o pensamento científico, as pessoas, os serviços e os espaços de entretenimento.

Por ter a oportunidade de trabalhar com alguém que soube me orientar e corrigir nos momentos indicados, pelos ensinamentos e conselhos, ao Professor Fabio Gregori.

Aos professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, por serem sempre tão receptivos amáveis e abertos a conversa, pela disposição e tempo, com certeza isso contribui de grande maneira na minha formação.

Aos funcionários do Departamento, por serem tudo de bom comigo, por sua ajuda e diversas orientações.

A todos os colegas, dos diversos laboratórios do departamento, pelas conversas, piadas, conselhos, não gostaria de colocar nomes, porque guardo grande estima a todos eles.

Aos colegas de outras faculdades, que conheci no decorrer deste tempo, brasileiros e estrangeiros, por que através de eles aprendi que todos somos iguais, e que podemos viver juntos em perfeita paz e amizade.

A CAPES (Processo: 5881-11-0 PEC PG) pela bolsa de estudo concedida.

E a minha família, principalmente meu pai e minha mãe, por todo o apoio brindado durante todo este caminho.

RESUMO

LUNA ESPINOZA, L. R. **Detecção e genotipagem de astrovírus em amostras fecais de aves de produção procedentes de diferentes criações comerciais brasileiras.** [Detection and genotyping of astrovirus in fecal samples of production poultry from different Brazilian commercial farms]. 2016. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Os astrovírus são agentes virais associados com enteropatias e infecções extra-intestinais em aves, ocasionando prejuízos no desenvolvimento produtivo e saúde animal. Porém, são escassos os estudos no Brasil que visem a detecção e caracterização deste vírus com maior amplitude. Nesse contexto, detectaram-se e caracterizaram-se cepas de astrovírus a partir de 60 amostras fecais de aves procedentes de diferentes criações comerciais brasileiras (postura, corte e matrizes), mediante o emprego de uma reação PanAstrovírus como triagem inicial, que consistiu numa reação de RT-hemi-nested-PCR, visando a amplificação e posterior sequenciamento de um segmento parcial do gene *RdRp* (RNA polimerase dependente de RNA) do gene *ORF1b*, uma região gênica conservada entre todos os astrovírus. Subsequentemente, nas amostras positivas na triagem, realizou-se a amplificação, clonagem e sequenciamento do gene *ORF2* codificante do capsídeo viral, analisado mediante análise filogenética. Os dados obtidos demonstraram uma frequência de infecção por astrovírus em 48,3% (29/60) das amostras analisadas. As espécies virais detectadas foram as seguintes: *Avastrovírus 2* (*Avian Nephritis Virus*, ANV) em 72,4% (21/29), *Chicken Astrovírus* (CAstV) em 6,8% (2/29) e *Avastrovírus 1* (*Turkey Astrovírus* tipo 1, TAsTV-1) em 20,8% (6/29) das amostras positivas. O sequenciamento total do gene *ORF2* foi possível em oito amostras (8/21) positivas a ANV, em uma amostra (1/6) positiva a TAsTV-1 e uma amostra (1/2) positiva para CAstV. A análise deste gene revelou, nas sequências ANV, a presença de três genótipos bem diferenciados, segundo critérios do *Astroviridae Study Group*, sendo que um deles, agrupou-se dentro do genótipo 5. Além disso, quando analisado com sequências procedentes de outras regiões, as sequências deste estudo formaram seis clusters, dois deles, relacionados com sequências procedentes de Austrália e Reino Unido. O análise do *ORF2* em CAstV, revelou também um agrupamento com cepas procedentes do Reino Unido. Já o análise da *ORF2* de TAsTV-1, revelou divergência genética com cepas isoladas em Estados Unidos, que foram as únicas sequências disponíveis no *GenBank*. O presente estudo traz a luz vários dados epidemiológicos concernentes aos astrovírus aviário de origem brasileira o que permitirá a realização de outros estudos relacionados a epidemiologia deste vírus, seus possíveis riscos

potenciais em saúde pública e a adoção de medidas de controle direcionadas a este agente.

Palavras-chave: Astrovírus aviário. Avicultura. Epidemiologia. Genótipos. Diversidade.

ABSTRACT

LUNA ESPINOZA, L. R. **Detection and genotyping of astrovirus in fecal samples of production poultry from different Brazilian commercial flocks.** [Detecção e genotipagem de *astrovírus* em amostras fecais de aves de produção procedentes de diferentes criações comerciais brasileiras]. 2016. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The astroviruses are viral agents associated with enteropathy and extraintestinal infections in poultry, causing injuries to the productive development and animal health. However, are scarce the studies in the Brazil that aimed to detection and characterization of this virus with greater scale. In this context, were detected and characterized astrovirus strains from 60 fecal samples of poultry from different Brazilian commercial flocks (laying hens, broilers and breeders) by using of the Pan-Astrovirus reaction as initial screening, consisting of RT-Hemi-nested PCR reaction, aiming the amplification and subsequent sequencing of a partial segment of the *RdRp* gene (RNA polymerase RNA dependent) of the *ORF1b* gene, a genic conserved region among all of the astroviruses. Thereafter, in the positive samples in the screening, amplification, cloning and sequencing of the *ORF2* gene, codificant of the viral capsid, was performed, and analyzed by phylogenetic analysis. The data obtained demonstrated a astroviruses frequency infection in 48,3% (29/60) of the analyzed samples. The viral species detected were the following: *Avastroviruses 2* (*Avian Nephritis Virus*, ANV) in 72,4 % (21/29), *Chicken Astrovirus* (CAstV) in 6,8% (2/29) and *Avastrovirus 1* (*Turkey Astrovirus type 1*, TAsTV-1) in 20,8% (6/29) of the positive samples. The total sequencing of the *ORF2* gene was possible in eight positive samples (8/21) to ANV, in one positive sample (1/6) to TAsTV-1 and a one positive sample (1/2) to CAstV. The analyze of this gene showed, in the ANV sequences, the presence of three distinct genotypes, according to the *Astroviridae Study Group* criteria, being one of them, was grouped within of the genotype 5. Furthermore, when analyzed with sequences from other regions, the sequences of this study, formed six clusters, two of them, related with sequences from Australia and United Kingdom. The *ORF2* analyze in CAstV showed likewise a grouping with strains from United Kingdom. And the analyze of TAsTV-1 *ORF2*, showed genetic divergence with strains isolated in United States of America, that were the only sequences available in the *GenBank*. The present study brings to light several data concerning to the Brazilian avian astroviruses, allowing to realization of the

others studies related to the epidemiology of this virus, theirs potential public health risks and the adoption of the control measures targeted to this agent.

Keywords: Avian astroviruses. Aviculture. Epidemiology. Genotypes. Diversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Organização genômica dos astrovírus. São esquematizados os genes <i>ORF1</i> (<i>ORF1a</i> e <i>ORF1b</i>) e <i>ORF2</i>	21
Figura 2 -	Representação do gene <i>ORF2</i> . A. Astrovírus humano. B. Astrovírus de peru (<i>TAstV-2</i>). O gene <i>ORF2</i> codifica para a poliproteína estrutural <i>VP90</i> , que consiste nas regiões conservadas (domínio <i>Shell</i> e P1), a região variável contendo o domínio P2 (espicula do capsídeo) e uma região C-terminal ácido que é clivado por caspases celulares que resulta no precursor <i>VP70</i> . <i>VP70</i> é posteriormente clivado por tripsinas em <i>VP34</i> , <i>VP27</i> e <i>VP25</i>	29
Figura 3 -	Processamento das proteínas não estruturais dos astrovírus.....	31
Figura 4 -	Ciclo de replicação dos astrovírus	33
Figura 5 -	Localização dos <i>primers</i> senso ANV preCAP e antisenso ANV postCAP (TODD et al. 2011)	47
Figura 6 -	Localização dos <i>primers</i> CAsV PreCAP e CAsV PostCAP (SMYTH et al., 2011) em diversas sequências de <i>CAsVs</i>	48
Figura 7 -	Localização dos <i>primers</i> senso (A) e antisenso (B) no genoma de <i>TAstV-1</i> (<i>Accession number</i> NC002470).....	48
Figura 8 -	Representação esquemática do plasmídeo vetor <i>pTZ57R/T</i>	50
Figura 9 -	Representação esquemática do processo de clonagem	53
Figura 10 -	Posições dos <i>primers</i> senso ANV interCAPF (azul) e ANV interCF (vermelho) dentro das sequências parciais do gene <i>ORF2</i> das amostras sequenciadas. Observa-se a afinidade parcial dos <i>primers</i> para as amostras de <i>ORF2</i>	56
Figura 11 -	Posições dos <i>primers</i> antisenso ANV interCAPR (vermelho) e ANV interCR (azul) (Reverso complemento da sequência do primer). Observe-se a afinidades parciais dos <i>primers</i> para as amostras de <i>ORF2</i>	57
Figura 12 -	Posições dos <i>primers</i> senso CAsV interCAPF (retângulo azul) e CAsV interCAPR (retângulo vermelho) na sequência de <i>ORF2</i> da cepa de <i>CAsV</i> detectada neste estudo	58
Figura 13-	Árvore filogenética construída com o método Maxima Verossimilhança através do modelo de substituição Tamura 3 parâmetros para a região parcial (370 nucleotídeos) do gene <i>RdRp</i> do <i>ORF1b</i> dos astrovírus. As	

	amostras deste estudo foram marcadas com um triângulo preto. Os números próximos a cada nó representam os valores de bootstrap de 1.000 repetições, sendo mostradas apenas aquelas maiores a 60%. A escala representa o número de substituições / sitio.....	63
Figura 14-	Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança e modelo de substituição TN93 G+I, com apenas as sequências de <i>ORF2</i> de ANV deste estudo, segundo localização geográfica	66
Figura 15 -	Alinhamento das sequências de aminoácidos preditos do gene <i>ORF2</i> das sequências deste estudo e visualização da localização dos domínios com relação à cepa <i>TAstV-2</i> e regiões conservadas (Continua).....	69
Figura 16 -	Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene <i>ORF2</i> . A árvore foi construída sob o método de Máxima Verossimilhança, usando o modelo de substituição GTR+G. As sequências deste estudo são mostradas com um triângulo preto ao lado. Os dois clados que não se agruparam com as sequências de referência foram denominadas para efeitos do estudo como “ <i>AAstV 8</i> ” e “ <i>AAstV 9</i> ”.....	74
Figura 17 -	Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos do capsídeo. A árvore foi construída sob o método de Máxima Verossimilhança, usando o modelo de substituição LG+G+I+F. São mostradas com um triângulo preto ao lado as sequências deste estudo. Os dois clados que não se agruparam com as sequências de referência foram denominadas para efeitos do estudo como “ <i>AAstV 8</i> ” e “ <i>AAstV 9</i> ”.....	75
Figura 18 -	Análise filogenética baseada nas sequências aminoacídicas do capsídeo viral. A árvore filogenética foi construída usando o método de máxima verossimilhança, usando o modelo de substituição LG+G+F	787
Figura 19 -	Análise filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do capsídeo viral. A árvore filogenética foi construída usando o método de máxima verossimilhança, usando o modelo de substituição nucleotídica GTR G+I. As amostras deste estudo foram marcadas com um triangulo preto.....	778
Figura 20 -	Análise filogenética baseada na sequência do gene <i>ORF2</i> da sequência de <i>CAstV</i> detectado neste estudo. A árvore foi construída empregando o método de Máxima Verossimilhança, usando o modelo de substituição GTR+G. A sequência deste estudo está marcada com um triângulo preto.....	80

Figura 21 - Análise de diversidade do *TAstV-1*, a árvore foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança, com o método de substituição K2P. A sequência deste estudo esta marcada com um triângulo preto.....81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Lista de genótipos do gênero <i>Avastrovírus</i> (<i>AAstV</i>)	22
Quadro 2 -	Descrição dos primers usados para a detecção de astrovírus.....	40
Quadro 3 -	Sequências de referência de cada uma das espécies de Astrovírus aviário reportado na literatura, utilizadas para a determinação da espécie viral.....	43
Quadro 4 -	Sequências de referência para determinação dos sete genótipos de <i>Avastrovírus</i> mediante análise do gene do capsídeo.....	44
Quadro 5 -	Sequência de primers usados na amplificação do gene <i>ORF2</i> em astrovírus...	47
Quadro 6 -	Constituição do vetor de clonagem <i>pTZ57R/T</i>	50
Quadro 7 -	Primers desenhados neste estudo e usados para o sequenciamento completo da sequência do gene <i>ORF2</i>	55
Quadro 8 -	Sequências exportadas do <i>GenBank</i> para a análise filogenética de diversidade baseada no gene codificante do capsídeo viral. Apresentam-se as sequências de origem europeia e asiática	59
Quadro 9 -	Amostras positivas empregando-se os primers dirigidos para <i>ORF2</i> , clonadas e sequenciadas para o capsídeo viral	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Amostras positivas a astrovírus por estado e tipo de criação	61
Tabela 2 -	Espécies de astrovírus detectados de acordo com o tipo de criação e estado de procedência.....	64
Tabela 3 -	Localização dos domínios proteicos dentro da sequência predita do capsídeo viral nas cepas ANV.....	67
Tabela 4	Matriz de distância- <i>p</i> entre as sequências dos distintos genótipos de ANV detectados neste estudo. <i>Cutoff</i> : 0,414-0,728 (entre genótipos) e 0,047-0,299 (intra-genótipo).....	73

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Árvore filogenética de genótipos de astrovírus das sequências de aminoácidos do gene *ORF2*, considerando as sequências do estudo, sequências para em bases de diversidades e sequências para análise do genótipo. As sequências do estudo são identificadas com um triângulo preto. A árvore foi construída usando Máxima Verossimilhança, com o modelo de substituição LG+G+F

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	ETIOLOGIA E TAXONOMIA	20
2.2	CLASSIFICAÇÃO DOS ASTROVÍRUS	22
2.2.1	Gênero <i>Mamastrovirus</i> (MAstV).....	22
2.2.1.1	Astrovírus humano (HAstV).....	23
2.2.1.2	Astrovírus suíno (PAstV)	23
2.2.1.3	Astrovírus de morcegos (BatAstV).....	24
2.2.1.4	Astrovírus de bovinos (BAstV).....	24
2.2.1.5	Astrovírus que infectam outros mamíferos	24
2.2.2	Gênero <i>Avastrovirus</i> (AAstV).....	24
2.2.2.1	Astrovírus detectados em perus, patos e outras aves domésticas.	25
2.2.2.2	Astrovírus associadas à doença em frangos de corte e poedeiras	26
2.2.2.2.1	Vírus da nefrite aviária (ANV)	26
2.2.2.2.2	<i>Chicken astrovirus</i> (CAstV)	27
2.2.2.3	Astrovírus em outras espécies de aves	28
2.3	PROTEÍNAS ESTRUTURAIS NOS ASTROVÍRUS	28
2.4	REPLICAÇÃO VIRAL	29
2.5	DOENÇAS ASSOCIADAS À ASTROVÍRUS EM AVES NO BRASIL	34
2.6	VARIABILIDADE GENÉTICA NOS ASTROVÍRUS	35
2.6.1	Mecanismos de diversificação genética	35
2.6.1.1	Substituições nucleotídicas	35
2.6.1.2	Recombinação genética.....	36
2.6.1.3	Transmissão interespecies.....	36

3	OBJETIVOS.....	38
4	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	AMOSTRAS DE CAMPO	39
4.2	EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS	39
4.3	REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA	39
4.4	REAÇÃO DE HEMI-NESTED PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>RPRD</i>	40
4.5	SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO	41
4.6	ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	41
4.7	DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE DE ASTROVÍRUS DETECTADA.....	42
4.8	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>ORF2</i> NAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA <i>AASTV</i>	43
4.8.1	Determinação da sequência do gene <i>ORF2</i>, codificadora do capsídeo viral, nas amostras positivas a astrovírus	44
4.8.2	Amplificação do gene <i>ORF2</i> nas amostras positivas a espécie <i>Avastrovírus</i> <i>2</i> (<i>Avian Nephritis Virus</i>, <i>ANV</i>), <i>Chicken Astrovírus</i> (<i>CAstV</i>) e <i>Avastrovírus</i> <i>1</i> (<i>Turkey Astrovírus tipo 1</i>, <i>TAstV-1</i>)	45
4.8.3	Purificação dos fragmentos de 2,5 kb do gel	49
4.8.4	Clonagem	49
4.8.4.1	Seleção das colônias de <i>E.coli</i> com os plasmídeos recombinantes.....	52
4.8.4.2	Sequenciamento dos clones	54
4.8.5	<i>Primer Walking</i>	55
4.8.6	Determinação dos genótipos das sequências de astrovírus aviário	58
4.8.7	Análise de diversidade das amostras de astrovírus	59
5	RESULTADOS	61
5.1	DIAGNÓSTICO DE ASTROVÍRUS NAS AMOSTRAS FECAIS	61

5.2	DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE DE ASTROVÍRUS MEDIANTE SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE UM FRAGMENTO DO GENE <i>ORF1B</i>	61
5.3	AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>ORF2</i> NAS AMOSTRAS POSITIVAS A ASTROVÍRUS	64
5.3.1	Amostras positivas para a espécie <i>Avastrovírus 2</i> (ANV)	64
5.3.2	Análises da sequência <i>ORF2</i> nas cepas de ANV	67
5.3.2.1	Características gerais das sequências preditas do gene <i>ORF2</i>	67
5.3.2.1.1	Determinação dos domínios na sequência de aminoácidos do gene <i>ORF2</i>	67
5.3.2.1.2	Regiões conservadas das sequências de ANV e entre as distintas espécies e/ou genótipos de astrovírus aviários	68
5.3.2.2	Determinação do genótipo das sequências de ANV deste estudo	71
5.3.2.3	Análise de diversidade das sequências de ANV	76
5.3.3	Análise da <i>ORF2</i> para a espécie <i>Chicken Astrovírus</i> (CAstV)	79
5.3.3.1	Análise de diversidade da cepa de CAstV	79
5.3.4	Análise do <i>ORF2</i> para TAstV-1	81
5.3.4.1	Análise de diversidade da cepa de TAstV-1	81
6	DISCUSSÃO	82
7	CONCLUSOES	90
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICES	101

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é a maior exportadora de carne de frango e a terceira maior produtora mundial (UBABEF, 2012), afirmando-se como uma importante atividade econômica dirigida a produção de carne, ovos e subprodutos, que são muito apreciados por ser fonte de proteína saudável e de alta qualidade. O incremento da produção traz consigo vários desafios, dentro deles os relacionados com a prevenção de doenças entéricas que afetam as aves e seus respectivos custos de produção (PORTER JR. et al., 1998).

Tais doenças entéricas ocasionam um grave impacto econômico na produção avícola, devido às perdas por baixa conversão alimentar e queda na produtividade, apresentando em sua maioria, uma etiologia complexa envolvendo diversos agentes bacterianos e virais (SPACKMAN; DAY; PANTIN-JACKWOOD, 2010).

Atualmente os astrovírus têm sido relatados como agente causador de doenças agudas em múltiplas espécies, incluindo humanos, bovinos, ovinos, felídeos, cães, aves, perus e anseriformes. Na maioria das vezes ocasionam uma gastroenterite mediana a leve e geralmente auto-limitante, ainda que formas mais severas da doença já foram descritas em aves (KOCI; SCHULTZ-CHERRY, 2002).

Os astrovírus aviários estão relacionados a casos de síndromes de atraso no crescimento em frangos de corte, complexo entérico em aves jovens e mortalidade por enterite em perus e frangos de corte (PANTIN-JACKWOOD et al., 2011), além de doença renal (SHIRAI et al., 1991). Nos últimos anos vem sendo relatados casos de nefrite aviária com grande frequência (PANTIN-JACKWOOD; TODD; KOCI, 2013).

No Brasil, astrovírus em perus já foram detectados em criações brasileiras, destes, Moura Alvarez et al. (2013) identificaram astrovírus de peru tipo 1 e 2 (*TAstV-1* e 2) e Vírus da Nefrite aviária (ANV) em 64,5%, 44,7% e 35,5% respectivamente em amostras de conteúdo intestinal de perus jovens e adultos sintomáticos e assintomáticos. Já em amostras procedentes de um surto de diarreia associada a mortalidade em perus jovens, Moura Alvarez et al. (2014) reportaram a presença de astrovírus de peru tipo 2 (*TAstV-2*) como o vírus mais frequentemente detectado depois dos coronavírus.

Entretanto os estudos sobre esta doença em frangos de corte e poedeiras são escassos,

tendo apenas como referências os estudos feitos por Bello (2012) e Mettifogo et al. (2014). Nesse sentido, em amostras procedentes de frangos de corte e poedeiras, Mettifogo et al. (2014) observaram uma frequência de 6,4% de astrovírus a partir de amostras em aves de várias idades com sintomas clínicos e em 4% em assintomáticas provenientes de várias regiões do Brasil, incluindo São Paulo. Já no estudo feito por Bello (2012) observou-se uma maior frequência de astrovírus em relação a outros vírus entéricos aviários em animais apresentando sintomatologia clínica.

O desenvolvimento de técnicas moleculares para a detecção deste vírus e o sequenciamento de genes virais fornece informações sobre a epidemiologia e melhor compreensão do agente etiológico nos indivíduos estudados, além de servir como parte de estudos de vigilância epidemiológica em casos de infecções entéricas em produções avícolas, importantes para estratégias de prevenção e controle (TAI et al., 2003).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os astrovírus são vírus relativamente pequenos, medindo entre 25 a 35 nm de diâmetro, não envelopados, descritos pela primeira vez em 1975 em crianças com diarreia mediante uso da microscopia eletrônica (MATSUI; GREENBERG, 1996). Desde então, estes vírus são frequentemente descritos no mundo inteiro em casos de infecções entéricas em humanos sugerindo-se como a segunda principal causa de gastroenterite em crianças depois dos rotavírus (CHAKRAVARTI et al., 2010).

Em animais, Snodgrass e Gray (1977) foram os primeiros a observar a ocorrência de astrovírus em bezerros apresentando diarreia, enquanto que a primeira evidencia de localização extraintestinal de astrovírus foi em 1980, em patos apresentando hepatite fatal (GOUGH et al., 1985).

2.1 ETIOLOGIA E TAXONOMIA

A família *Astroviridae* compreende vírus RNA de fita simples, senso positivo, com genoma de 6.8 a 7.9 kb, que inclui uma região não traduzida 5' (*UTR*) seguido de 3 quadros de leitura aberta (*ORFs*), denominados *ORF1a*, *ORF1b* (os dois dentro da região gênica *ORF1ab*) e *ORF2*, uma região 3'*UTR* e uma cauda poli-A. A região *ORF1ab* codifica uma proteína não estrutural, que é clivada em outras duas proteínas devido a presença de uma estrutura *frame-shift*, sendo elas uma serina-protease e a RNA dependente de RNA polimerase (*RdRp*) (MENDEZ et al., 2003). A região *ORF2* codifica a proteína do capsídeo viral. O comprimento destas estruturas é variável entre espécies e sorotipos (VAN REGENMORTEL; FAUQUET; BISHOP, 2000) (Figura 1).

Figura 1 - Organização genômica dos astrovírus. São esquematizados os genes ORF1 (*ORF1a* e *ORF1b*) e *ORF2*.

Fonte: (BOSCH et al., 2011).

Foram definidos até o momento dois gêneros dentro da família *Astroviridae*, denominados *Mamastrovirus* (*MAstVs*) e *Avastrovirus* (*AAstVs*), infectando respectivamente mamíferos e aves (MENDEZ; ARIAS, 2007). Baseado na espécie do hospedeiro de origem, o ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia Viral) em 2014 (ICTV, 2014) agrupou seis espécies dentro do gênero *MAstVs* e três dentro do gênero *AAstVs*, porém, o recente descobrimento de novos astrovírus em mamíferos e aves ressaltam o fato que estes vírus não podem mais ser classificados apenas pela espécie do hospedeiro. A classificação em genótipos dentro dos gêneros leva agora também em consideração diferenças genéticas baseadas em comparações da sequência completa do capsídeo. Tomando-se este critério, os gêneros *MAstV* e *AAstV* podem ser divididos em 33 e 7 espécies, respectivamente, mostrando que os astrovírus tem uma marcante diversidade genética aliado a um amplo espectro de hospedeiros (GUIX; BOSCH; PINTÓ, 2013) (Quadro 1).

O ICTV (2014) descreve seis espécies dentro do gênero *MAstV*: Astrovírus Bovino, Astrovírus Felino, Astrovírus Humano, Astrovírus do *Mink*, Astrovírus Ovino e Astrovírus Suíno, e três espécies dentro do gênero *AAstV*: Astrovírus das Galinhas/Frangos, Astrovírus do Pato e Astrovírus do peru (BOSCH et al., 2011; ICTV, 2014).

Devido à dificuldade do isolamento do vírus em cultura celular e carência de modelos animais para realizar o sorotipagem do vírus, técnicas moleculares tendo como critério a porcentagem de similaridade da sequência que codifica o capsídeo são comumente empregadas (GUIX; BOSCH; PINTÓ, 2013).

Quadro 1 - Lista de genótipos do gênero *Avastrovírus* (AAstV)

Genótipo	Hospedeiro de origem	Cepa representativa / código de acesso	Sorotipos / linhagens	Doença associada
AAstV 1	Peru (<i>Meleagris meleagris</i>)	<i>Turkey Astrovirus</i> 1 (TAstV-1) / Y15936	-	Diarreia, diminuição do crescimento.
AAstV 2	Frango (<i>Gallus gallus</i>)	<i>Avian Nephritis virus</i> (ANV) / AB033998 (ANV-1); AB046864 (ANV-2)	ANV-1	Depressão do crescimento e lesões renais
	Peru (<i>Meleagris meleagris</i>)		ANV-2	
AAstV 3	Peru (<i>Meleagris meleagris</i>)	<i>Turkey Astrovirus</i> 2 (TAstV-2) / AY769615 (TAstV-2); AY769616 (TAstV-3)	TAstV-2 / 1987	Síndrome de mortalidade entérica dos perus (PEMS)
	Galinha d'angola (<i>Numida meleagris</i>)		TAstV-3 / 2001	
	Pato (<i>Anas platyrhynchos domestica</i>)	<i>Duck Astrovirus</i> 1 (DAstV-1) / FJ434664	-	Hepatite fatal em patos jovens
AAstV 4	Frango (<i>Gallus gallus</i>)	<i>Chicken Astrovirus</i> (CAstV) / JF414802	-	Síndrome de nanismo e retraço (RSS), diarreia leve e distensão do intestino delgado em pintinhos.
AAstV 5	Pombo (<i>Columbia livia</i>)	<i>Pigeon Avian Nephritis virus</i> (Pi-ANV) / HQ889774	-	Diarreia em pombos de duas semanas de idade
	Frango (<i>Gallus gallus</i>)	<i>Pigeon Avian Nephritis virus</i> (Pi-ANV) / HM029238		Infecção assintomática em pintinhos
AAstV 6	Pombo torcaz (<i>Columba palombus</i>)	<i>Wood pigeon astrovirus</i> (WPiAstV) / FR727149	-	-
AAstV 7	Pombo (<i>Columbia livia</i>)	<i>Feral pigeons astrovirus</i> (FPiAstV) / FR727146 – FR727148	-	-

Fonte: (GUIX et al., 2013).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS ASTROVÍRUS

2.2.1 Gênero *Mamastrovírus* (MAstV)

Até o momento detectaram-se astrovírus em 31 hospedeiros mamíferos, 14 deles correspondentes a diferentes espécies de morcegos, os quais podem atuar como reservatórios.

O gênero *MAstV* é apresenta 33 genótipos (*MAstV* 1 - 33) adotando-se como ponto de corte a distância genética (*p*) de nucleotídeos e de aminoácidos dentro de um intervalo de 36,8% a 78,1% e de 0% a 31,8%, respectivamente (BOSCH et al., 2011; GUIX; BOSCH; PINTÓ, 2013).

2.2.1.1 Astrovírus humano (*HAstV*)

Um total de 4 (4/33) genótipos de *MAstV* correspondem a vírus humanos que co-circulam na população: *MAstV* 1 (oito sorotipos do clássico *HAstV*), *MAstV* 6 (*HAstV* MLB1 que têm dois sorotipos), *MAstV* 8 (*HAstV* HMO-A e *HAstV* VA2) e *MAstV* 9 (*HAstV* HMO-B, *HAstV* HMO-C, *HAstV* VA1 e *HAstV* PS) (MEDINA et al., 2000; FINKBEINER; KIRKWOOD; WANG, 2008; FINKBEINER et al., 2009; KAPOOR et al., 2009; QUAN et al., 2010; HOLTZ et al., 2011). Apenas o clássico *HAstV* (*MAstV* 1) tem uma associação clara com doença gastrointestinal, enquanto os outros genótipos mais divergentes, apesar de serem isolados de fezes, não tem um papel definido em doenças humanas (KAPOOR et al., 2009).

2.2.1.2 Astrovírus suíno (*PAstV*)

Relatos recentes demonstram a existência de múltiplas linhagens genéticas nos suínos ao redor do mundo, que podem atuar como reservatórios para a transmissão zoonótica (LUO et al., 2011). Similarmente como acontece com *HAstV*, os *PAstV* não se agrupam apenas num grupo monofilético, sugerindo diferentes origens e numerosas transmissões interespecies, nas quais podem estar envolvidos os humanos. Estão definidos 7 genótipos de *MAstV* para astrovírus suínos, agrupados em 5 linhagens genéticas (*PAstV* 1 - 5) (LAURIN et al., 2011; REUTER; PANKOVICS; BOROS, 2011; SHAN et al., 2011). Dentro do genótipo *MAstV* 24 (*PAstV* 5) também é possível achar astrovírus isolados em ovelhas, indicando que o mesmo vírus pode infectar diferentes espécies de hospedeiros, aliado ao risco de recombinação com outros vírus que infectam o mesmo hospedeiro (ULLOA et al., 2010; LAN et al., 2011).

2.2.1.3 Astrovírus de morcegos (*BatAstV*)

Relatos na China (CHU et al., 2008; XIAO et al., 2011) e na Alemanha (DREXLER et al., 2011) demonstram a identificação de novos grupos de astrovírus em morcegos aparentemente saudáveis. *BatAstV* estão enquadrados em sete genótipos: *MAstV* 12, *MAstV* 14, *MAstV* 15, *MAstV* 16, *MAstV* 17, *MAstV* 18 e *MAstV* 19 (BOSCH et al., 2010a).

2.2.1.4 Astrovírus de bovinos (*BAstV*)

Análises filogenéticas de sequências de genoma completo indicam uma relação com diversos astrovírus suínos e de cervídeos (*Capreolus capreolus*) (TSE et al., 2011). Foram identificados quatro genótipos de *BAstV*: *MAstV* 28, *MAstV* 29, *MAstV* 30 e *MAstV* 33. Destes, o genótipo *MAstV* 33 foi isolado de outras espécies de animais, como a corça (*CcAstV*), sugerindo que este genótipo pode infectar diferentes hospedeiros, além de reportar pelo menos um evento de recombinação entre a cepa de *BAstV* e *CcAstV* durante a evolução do vírus (TSE et al., 2011).

2.2.1.5 Astrovírus que infectam outros mamíferos

Através da metagenômica viral, foi possível a identificação de astrovírus infectando outros mamíferos, como cachorros, gatos, ovelhas, visons, ratos, camundongos, coelhos, guepardos e diversos mamíferos marinhos (leões marinhos da Califórnia e golfinhos nariz de garrafa) (DE BENEDICTIS et al., 2011; GUIX; BOSCH; PINTÓ, 2013).

2.2.2 Gênero *Avastrovirus* (*AAstV*)

Os relatos de astrovírus em aves são anteriores aos feitos em mamíferos, como a hepatite

fatal em patinhos, descrito em 1965 e o vírus da nefrite aviária (ANV), isolado em 1976, associado com depressão no crescimento e lesões nos rins em frangos jovens (GOUGH et al., 1985; IMADA et al., 2000).

Em hospedeiros aviários, os astrovírus são relacionados a enterites e a “síndrome entérica e de mortalidade” (*Poult Enteritis and Mortality Syndrome, PEMS*) em aves jovens, frango e galinha pintada, caracterizada por nefrite, “síndrome de nanismo e atraso no crescimento” (*Runting and Stunting Syndrome, RSS*) em frangos e hepatite fatal em filhotes de patos (KANG et al., 2011; PANTIN-JACKWOOD et al., 2011). É considerado como uma das principais causas de gota (acumulação de cristais de uratos nos túbulos renais) em criações comerciais de frangos, junto ao vírus da bronquite infecciosa nefropatogênica (IBV) (BULBULE; KAPGATE; CHAWAK, 2014).

De acordo com os novos critérios propostos pelo *Astroviridae Study Group* (BOSCH et al., 2010b), os *AAstV* são classificados em 7 genótipos, tendo uma distância *p* em termos de nucleotídeos e aminoácidos similares ao *MAstVs*, num intervalo de 41,4% a 72,8% e 4,7% a 29,9%, respectivamente (GUIX; BOSCH; PINTÓ, 2013) (Tabela 1). Estes genótipos identificados em aves, baseados nas espécies de origem e genoma viral, estão codificadas desde *AAstV*-1-7, os quais, o *AAstV*-1 tem como cepa representativa ao astrovírus detectado em perus, *Turkey Astrovirus* tipo 1 (*TAstV*-1), o *AAstV*-2, que tem o Vírus da nefrite aviária (*Avian Nephritis Virus, ANV*), detectado em aves e perus, o *AAstV*-3, o Astrovírus do peru tipo 2 (*TAstV*-2) e Astrovírus de pato (*Duck Astrovirus* tipo 1, *DAstV*-1), o *AAstV*-4, representado pelo Astrovírus de frango (*Chicken Astrovirus, CAstV*), e os genótipos *AAstV* 5, 6 e 7, detectados majoritariamente em pombos (GUIX; BOSCH; PINTÓ, 2013).

2.2.2.1 Astrovírus detectados em perus, patos e outras aves domésticas.

Os astrovírus detectados em perus, *TAstV* 1 e *TAstV* 2, pertencentes aos genótipos *AAstV* 3 e *AAstV* 1 respectivamente, estão amplamente disseminados, tendo o tipo 2 maior diversidade e prevalência, enquanto o tipo 1 foi detectado tanto em perus sadios como com doença entérica (PANTIN-JACKWOOD; TODD; KOCI, 2013).

Existem pelo menos dois sorotipos de *TAstV* 2 (TANG; SAIF, 2004), enquanto que não há qualquer informação acerca dos isolados *TAstV*-1. Eventos de recombinação entre *TAstVs*

circulantes em granjas de perus já foram observados (TANG; SAIF, 2004). Ambos os genótipos, mas principalmente o *TAstV-2*, está frequentemente associado com enterite e síndrome de mortalidade (*PEMS*), causando problemas econômicos em produção comercial de perus jovens (PANTIN JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2006).

Lesões comuns macroscópicas observadas pela infecção por *TAstV-2* incluem desidratação, intestinos distendidos cheios de fluidos aquosos, alimento não digerido e ceco dilatado com conteúdo espumoso. Microscopicamente, as lesões incluem hiperplasia das criptas, atrofia da vilosidade e infiltração linfocítica, estando estes mais comumente presentes no jejuno, estando o vírus presente nos enterócitos da vilosidade e da cripta em todos os segmentos do intestino delgado (KOCI et al., 2003).

Estudos em infecção experimental em perus jovens inoculados com *TAstV-2*, desenvolveram diarreia dois dias pos infecção por diversos dias (KOCI et al., 2003).

O genótipo *AAstV 3* contém astrovírus capazes de infectar outras espécies de animais, como a galinha d'angola (*Numida meleagris*), que é sugestiva de transmissão interespecie. Também dentro deste genótipo está contido o astrovírus associado como hepatite fatal em filhotes de patos, que de ponto de vista filogenético, é ancestral de perus (FU et al., 2009).

2.2.2.2 Astrovírus associadas à doença em frangos de corte e poedeiras

2.2.2.2.1 Vírus da nefrite aviária (ANV)

O ANV é amplamente distribuído em frangos, caracterizado dentro do genótipo *AAstV-2*. O ANV também tem sido descrito em perus, embora estas infecções não tenham sido associadas com doença nestas aves (PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOOLCOCK, 2006). Este vírus foi isolado por primeira vez em frangos jovens usando células renais de frango (CK) em 1976 (YAMAGUCHI; IMADA; KAWAMURA, 1979).

As cepas de ANV de campo exibem diferentes graus de patogenicidade em frangos, resultando desde infecção subclínica até a morte, existindo pelo menos dois sorotipos, ANV-1

e ANV-2, observando-se baixos níveis de reatividade cruzada entre estes (SHIRAI et al., 1991). Além disso, estes sorotipos compartilham uma identidade na sequência do gene *ORF2* (que codifica para o capsídeo) e a região 3'UTR do genoma viral de 69% e 71% ao nível de nucleotídeos e aminoácidos respectivamente (TODD et al., 2011). Pantin-Jackwood, Spackman e Woolcock (2006) têm reportado identidades de 86,2 a 99,6% em nucleotídeos e 92,4-100% em aminoácidos em sequências parciais do gene *ORF1b* entre cepas de ANV procedentes de amostras de perus e frangos.

Infecções experimentais do vírus ANV resultam na maioria das vezes em doença subclínica, embora casos de retardo do crescimento e mortalidade sejam possíveis (IMADA; YAMAGUCHI; KAWAMURA, 1979; MAEDA et al., 1979). ANV ocasiona também alterações histológicas nos rins e o antígeno viral pode ser detectado em outros tecidos, como fígado, baço, pâncreas, jejuno e reto (IMADA et al., 1983). As aves jovens são as mais suscetíveis a infecção e tornam-se resistentes depois do primeiro mês de vida (IMADA et al., 1981). Infecções por ANV em pintinhos podem variar de subclínica a surtos de RSS e nefropatia (TAKASE et al., 1989; SHIRAI et al., 1991), porém o papel da infecção por ANV em casos de RSS ainda não é claro. Além disso, recentemente novas cepas de ANV têm sido isoladas de frangos e perus com doenças semelhantes ao RSS e/ou problemas locomotores (DE WITT et al., 2011).

2.2.2.2.2 Chicken astrovirus (*CAsV*)

A detecção deste vírus em frangos de corte está associada com fraco rendimento do crescimento (SMYTH et al., 2009). Em aves afetadas por nefrite e depósitos de minerais nos tecidos, foi detectado altos níveis de RNA e antígeno de *CAsV* em tecido renal (PANTIN-JACKWOOD; TODD; KOCI, 2013). Infecções experimentais com *CAsV* em poedeiras de 1-5 dias de idade podem causar diarreia leve e dano moderado e limitado apenas na base da vilosidade do intestino delgado em algumas aves, sem alterações histológicas aparentes em fígado, rim, baço, timo e bursa (BAXENDALE; MEBATSION, 2004). Três ensaios de infecção experimental com *CAsV* em frangos de corte de 1 dia de idade com anticorpos maternos contra o vírus ocasionou retardo no crescimento de 11,3%, 20,4% e 9,6% (MCNEILLY et al., 1994). Outros experimentos conduzidos usando diferentes cepas de

CAstV manifestaram alterações histológicas leves no intestino e fígado, e moderadas no rim e pâncreas (SHIRAI et al., 1992).

2.2.2.3 Astrovírus em outras espécies de aves

Infecções por astrovírus em pombos ocasionando diarreia já foram identificadas sendo estes similares a um ANV isolado de uma granja de frangos sadios da mesma localidade, denominado *Pigeon ANV (Pi-ANV)*, enquadrando dentro do genótipo *AAstV 5* (ZHAO et al., 2011b).

2.3 PROTEÍNAS ESTRUTURAIS NOS ASTROVÍRUS

Os astrovírus possuem no seu genoma três *ORFs*: *ORF1a*, *ORF1b* e *ORF2*. Estas codificam as proteínas não estruturais RNA polimerase viral dependente de RNA (*RdRp*) e o capsídeo viral (WILLCOCKS et al., 1994). O capsídeo dos astrovírus é responsável pela ligação e ingresso na célula hospedeira (BASS; UPADHAYULA, 1997), sendo uma proteína de múltiplos domínios com uma região conservada N-terminal enquanto que a porção C-terminal, é altamente variável (KRISHNA, 2005). A região N-terminal compreende os domínios nomeados Básico, S (*Shell*) e P1, e formam a camada externa do capsídeo. Já o domínio variável C-terminal compreende a espícula (chamada também de domínio P2) e domínios ácidos (DONG et al., 2011). O domínio ácido é removido do vírus maduro por caspases celulares, deixando apenas as espículas que sobressaem da superfície do capsídeo. O capsídeo sofre maturação por proteases extracelulares do hospedeiro para tornar-se uma partícula infecciosa (DRYDEN et al., 2012) (Figura 2).

A proteína de espícula dos astrovírus é importante no reconhecimento com o receptor da célula hospedeira, dada a capacidade de neutralização por anticorpos monoclonais específicos (BASS; UPADHAYULA, 1997). Estudos feitos na proteína do capsídeo viral dos *AAstVs*, especificamente do *TAstV-2*, onde foram determinadas as extensões em aminoácidos (aa) de cada domínio presente na proteína capsídeo viral, a saber: domínio básico, S e P1 (domínio

conservado N-terminal) com 423 aa; domínio variável C-terminal com 301 aa, subdomínios P2 (espícula) 208 aa e o ácido com 94 aa (DUBOIS et al., 2013).

A clivagem com tripsina do capsídeo viral melhora grandemente a infecção (3-5 vezes a mais), por isso provavelmente este processo é dependente deste mecanismo (MENDEZ et al., 2002). A clivagem por tripsina da poliproteína precursora produz em *HAsV-8* três produtos finais: *VP34*, *VP25* e *VP27* (MENDEZ et al., 2002) (Figura 2). *VP34* representa o domínio conservado e forma o núcleo do capsídeo, enquanto que *VP25* e *VP27* formam as espículas da superfície do vírus (DONG et al 2011), anticorpos que reconhecem as proteínas *VP25* e *VP27* são sorotipo específico e são capazes de neutralizar a infecção viral, provavelmente por bloqueio da união do vírus com a célula (SANCHEZ-FAUQUIER et al., 1994).

Figura 2 - Representação do gene *ORF2*. A. Astrovírus humano. B. Astrovírus de peru (*TAsV-2*). O gene *ORF2* codifica para a poliproteína estrutural *VP90*, que consiste nas regiões conservadas (domínio *Shell* e *P1*), a região variável contendo o domínio *P2* (espícula do capsídeo) e uma região C-terminal ácido que é clivado por caspases celulares que resulta no precursor *VP70*. *VP70* é posteriormente clivado por tripsinas em *VP34*, *VP27* e *VP25*

Fonte: (DUBOIS et al., 2013; BOSCH et al., 2014).

2.4 REPLICAÇÃO VIRAL

Os estados iniciais da infecção nas células hospedeiras têm sido pouco caracterizados, desconhecendo-se o receptor celular usado pelo vírus, mas é sugerido que podem usar mais de um receptor celular, como tem sido observado em *HAsV* (BRINKER; BLACKLOW;

HERRMANN, 2000). Donelli et al. (1992), demonstra que o vírus ingressa na célula a través de um mecanismo que implica endocitose mediada por clatrina, sendo requerido também para a infecção um endossomo de pH ácido, como foi observado em *HAsV-1*.

O mecanismo pelo qual o genoma é liberado da partícula viral infectante no citoplasma para sua tradução e os fatores celulares e virais envolvidos é desconhecido. A interação do *HAsV* com a célula hospedeira ocasiona ativação da via *ERK1/2* (*extracellular signal regulated kinase*) dentro de 15 minutos após a união viral, embora este mecanismo é independente da replicação viral e parece ser ativado apenas durante a união do vírus ou ingresso na célula (MOSER; SCHULTZ-CHERRY, 2008). A inibição da ativação da via *ERK1/2* bloqueia a síntese de proteínas e RNA viral, consequentemente, reduz a liberação de partículas virais (MOSER; SCHULTZ-CHERRY, 2008). Também se tem observado que a infecção viral incrementa a permeabilidade da membrana celular, o que possivelmente seja mais um requerimento para a entrada do vírus na célula (MOSER; CARTER; SCHULTZ-CHERRY, 2007).

Depois da liberação do RNA genômico, este é traduzido em proteínas não estruturais (*NSP*). Sugere-se que os astrovírus, ao igual que os picornavírus e calicivírus, contém um *motif VPg 5'* em vez da tradicional *7-metil CAP* na região *5'* terminal, e pode recrutar e atuar com a proteína de união a *CAP* e *eIF4E*, para iniciar a translação (AL MUTAIRY et al., 2005).

As proteínas não estruturais (*NSP*) são traduzidas como duas poliproteínas, *nsp1a* (~101 kDa) e *nsp1ab* (~160 kDa) do RNA genômico ligado ao *VPg*. A poliproteína não estrutural *nsp1ab* pode ser expressa devido ao *RFS* (*ribosomal frameshifting*) que existe entre *ORF1a* e *ORF1b* (JIANG et al., 1993) (Figura 3).

Figura 3 - Processamento das proteínas não estruturais dos astrovírus

Fonte: (BOSCH et al., 2014).

Nsp1a e *nsp1b* são clivadas por uma serina protease viral para produzir proteínas não estruturais individuais, embora proteases celulares também estejam envolvidas neste processo (GIBSON et al., 1998). O número e tamanho das NSP finais não estão plenamente elucidados e diversos estudos descrevem produtos intermediários e finais de diferentes tamanhos, porém são ao menos cinco NSP produzidas, de 20 kDa, 27 kDa (serina protease viral), 21-27 kDa, 57 kDa (*RdRp*) e outras de tamanho desconhecido (MENDEZ et al., 2013) (Figura 3).

O produto de tradução primário do gene *ORF2* dos astrovírus é uma proteína de 87-90 kDa (nomeado como *VP90* em *HAsTV*) sintetizado a partir de um RNA sub-genômico (*sgRNA*) viral, e este mecanismo de tradução está envolvido a presença do *VPg-5'*, como visto em calicivírus (HERBERT; BRIERLEY; BROWN, 1997). Esta proteína é clivada posteriormente na região carboxi-terminal por caspases celulares, além de eventos de

clivagem intermediárias, para produzir uma proteína de 70 kDa (*VP70*) (MENDEZ et al., 2002). A clivagem da proteína *VP90* para *VP70* está associada com a saída dos vírus da célula hospedeira, ficando claro que os vírus extracelulares estão apenas constituídos por *VP70*, sendo essencial para ativar sua infectividade o tratamento com tripsina. Este tratamento proteolítico do *VP70* cliva a proteína em três produtos de 25, 26 e 34 kDa (em *HAsV-8*), ou produtos de tamanho similar em outros astrovírus estudados, fazendo que a infectividade viral aumente em 105 vezes mais (LEE; KURTZ, 1981; BASS; QIU, 2000) (Figura 4).

A proteína *VPg* ligada ao genoma dos astrovírus (observado em *HAsV*) tem um papel essencial na infectividade viral, mediando o descapsidação do RNA viral, a remoção da proteína *VPg* por tratamento proteolítico suprime a capacidade infectante do vírus (FUENTES et al., 2012).

O processamento do genoma durante a replicação aparenta seguir o mesmo caminho dos RNAs virais de senso positivo, depois da tradução do RNA e processamento proteolítico das *NSP* se forma o complexo viral replicase, que utiliza o RNA viral como molde para produzir uma molécula de senso negativo, que é detectado 6-12 horas pós-infecção (JANG et al., 2010). O complexo replicase dos vírus RNA de senso positivo usualmente contém o *RdRp* viral e outras *NSPs*, assim como outras proteínas do hospedeiro necessárias para a replicação do genoma viral. Em caso dos astrovírus, além da polimerase viral, tem se demonstrado o requerimento da proteína *nsp1a/4* (correspondente à região C-terminal do *nsp1a*) (FUENTES et al., 2011). O RNA de senso negativo serve de molde para o RNA genômico (*gRNA*) viral de senso positivo e RNA subgenômicos (*sgRNA*, ~2,4 kb de longitude) (MONROE et al., 1991). A síntese do *sgRNA* provavelmente requer uma sequência interna no *gRNA* de senso negativo que serve como um promotor para a transcriptase do vírus (WALTER et al., 2001).

Figura 4 - Ciclo de replicação dos astrovírus

Fonte: (BOSCH et al., 2014).

2.5 DOENÇAS ASSOCIADAS À ASTROVÍRUS EM AVES NO BRASIL

Os astrovírus têm sido relatados como agentes causadores de diversas doenças agudas em múltiplas espécies, que acarretam em gastroenterites, geralmente de patogenicidade leve a moderada e autolimitante, mas sendo descritas formas mais severas na produção avícola (KOCI; SCHULTZ-CHERRY, 2002). No Brasil, estudos feitos em *Avastrovírus* correspondem em sua maioria à detecção destes em perus (*TAstVs*).

Villarreal et al. (2006), reportaram a detecção de *TAstV-2* em amostras de conteúdo intestinal procedentes de várias criações de perus com problemas de diarreias, perda de peso, prostração e mortalidade localizadas no sudeste do Brasil.

Da Silva et al. (2008) descreveram frequências de detecção de *TAstV-2* em 50-100% de amostras (bursa, timo, baço e *swabs* cloacais) procedentes de perus de 45 dias de idade procedentes de uma criação comercial com sintomatologia compatível com *PEC* (*Poult enteritis complex*). Da Silva et al. (2009) também descreveram a detecção de *TAstV-2* em criações de perus endêmicos a este vírus (prevalência de ao menos 25%), sendo achado em fezes, *swabs* cloacais, soro, bursa, timo, baço e conteúdo íleo cecal, reportando-se uma frequência de detecção de entre 70-100% das amostras.

Já Moura Alvarez et al. (2013), reportaram a presença dos dois tipos de astrovírus de perus, *TAstV-1* e *TAstV-2*, e *ANV* em amostras de conteúdo intestinal de perus (1-18 semanas de idade) com e sem sintomas de infecção entérica, sendo maiormente detectado *TAstV-1* em relação ao *TAstV-2* e *ANV*, principalmente em aves na fase de terminação (5-18 semanas de idade). Em outro estudo, Moura Alvarez et al. (2014), descreveram a detecção de *TAstV-2* em fezes de perus de 2 a 14 semanas de idade procedentes de criações comerciais com problemas de diarreia severa, perda de peso, prostração e eriçamento das penas.

Bello (2010) fez a primeira detecção de astrovírus em frangos de produção no Brasil, descrevendo a infecção por *CAstV* em indivíduos de corte principalmente, além de reprodutoras e poedeiras, apresentando na maioria deles, sinais clínicos de enterite (diarreia, emagrecimento e apatia).

Mettifogo et al. (2014), reportaram a presença dos vírus *ANV* e *CAstV* em aves de produção, sendo mais frequente em indivíduos com sinais clínicos (diarreia, retardo no crescimento, perda de peso e mortalidade).

2.6 VARIABILIDADE GENÉTICA NOS ASTROVÍRUS

A enzima *RdRp* dos vírus RNA é importante para o vírus, não só através do processo de replicação, também como eixo da variabilidade genômica e evolução; porém, é passível de erros, sendo detectada a introdução de uma alta taxa nos genomas RNA virais (na ordem de 10^{-4}), além disso, esta enzima está implicada também no mecanismo de recombinação genética, um dos pilares da evolução dos vírus RNA (RAMIREZ et al., 2005). Os astrovírus não são a exceção, de fato, a variabilidade foi descrita em quase todas as espécies de *MMaVs* e *AaVs* analisadas (LIU et al., 2008; FINKBEINER et al., 2009; KAPOOR et al., 2009; TODD et al., 2009; CHU et al., 2010; PANTIN-JACKWOOD et al., 2011;).

Através das técnicas de sequenciamento de nova geração, novos e altamente divergentes astrovírus infectando mamíferos e aves foram descritos. Esta ampla variedade de espécies infectadas, a diversidade genética dos vírus e a ocorrência de eventos recombinatórios indicam ou implicam a transmissão interespecie e posterior adaptação viral a novos hospedeiros e/ou co-infecção do mesmo hospedeiro com diferentes astrovírus (DE BENEDICTIS et al., 2011). A reconstrução dos eventos evolucionários da família *Astroviridae* indica que a separação entre as linhagens virais de mamíferos e aves ocorreu 310 milhões de anos atrás e foi seguido pela divergência entre os vírus mamíferos e a ocorrência de diversas transmissões interespecie (VAN HEMERT; BERKHOUT; LUKASHOV, 2007). Depois da transmissão interespecie, os vírus adaptados aos seus novos hospedeiros diversificam-se eles mesmos geneticamente.

2.6.1 Mecanismos de diversificação genética

2.6.1.1 Substituições nucleotídicas

A variabilidade genética pode ser induzida por substituições nucleotídicas sinônimas ou não sinônimas, esta última submetida a uma forte pressão de seleção negativa ou positiva, e assim, em astrovírus se sugere que diferentes regiões genômicas são submetidas a pressões e restrições evolutivas (DE BENEDICTIS et al., 2011). Neste sentido, Lukashov e Goudsmit

(2002) e Strain et al. (2008), observaram que as regiões da cápside dos astrovírus expostos à pressão imunológica e mudanças médio ambientais, como os epítomos ou sítios de interação com a célula hospedeira, são submetidos a seleção positiva e mudanças de códons.

2.6.1.2 Recombinação genética

Existe evidência sobre eventos de recombinação que ocorrem nos astrovírus, que contribuem a incrementar a variabilidade genética. Um dos primeiros casos descritos de recombinação foi observado em cepas de *HAsVs*, onde foi caracterizado um *HAsV* associado com diarreia em crianças, identificando um vírus com o gene *ORF2* de *HAsV-5* e uma região *ORF1b* pertencente a *HAsV-3*, sugerindo-se que a recombinação teve lugar na região de transição *ORF1b-ORF2* (WALTER et al., 2001). Outros casos de recombinação na mesma região genômica já foram relatados em outros genótipos de *HAsVs* (WOLFAARDT et al., 2011). Eventos de recombinação acontecendo em vírus animais foram previamente descritas pelo menos durante a evolução do *BoAstV* (*Bovine Astrovirus*) e *CcAstV* (*Capreolus capreolus Astrovirus*) (TSE et al., 2011). Diversos estudos apontam também eventos de recombinação em cepas de *TAsVs* circulantes nos Estados Unidos (PANTIN-JACKWOOD; SPACKMAN; WOLLCOCK, 2006; STRAIN et al., 2008). Trabalhos recentes descrevendo casos de recombinações entre *HAsV* com um astrovírus de leão-marinho da Califórnia (*Zalophus californianus*) (RIVERA et al., 2010) e um *HAsV-3* com um *PoAstV* (*Porcine Astrovirus*) (ULLOA; GUTIERREZ, 2010), indicam a possibilidade de recombinação de astrovírus animais com astrovírus humanos o que facilitaria uma transmissão zoonótica, emergência e disseminação de novos vírus na população humana e animal.

2.6.1.3 Transmissão interespecies

A presença de vírus que infectam mais de uma espécie animal indicaria que a transmissão interespecies é frequente, especialmente observado em vírus aviários detectados em aves domesticas (BIDIN et al., 2012), e vírus detectados em suínos e humanos (ULLOA; GUTIERREZ, 2010). Dentro dos vírus humanos, é interessante destacar a continua introdução

de diversos genótipos de *HAsVs* na população humana (JIANG et al., 2013), consequentemente sugerindo um alto potencial zoonótico destes vírus.

Casos de transmissão interespecie envolvendo *AAsVs* foram descritos em patos e galinha d'angola, demonstrado pela estreita relação genética entre o vírus da hepatite do pato e o astrovírus da galinha d'angola com o *TAsV-2* (CATTOLI et al., 2007; FU et al., 2009). Além disso, astrovírus ANV-1 detectado em conteúdos intestinais em perus aparentemente saudáveis nos Estados Unidos (PANTIN-JACKWOOD et al., 2006), sugere também a possibilidade de transmissão interespecie. Embora ainda não fosse documentada a transmissão zoonótica de astrovírus animais a humanos, existe alguma possibilidade deste evento acontecer. Baseados em análises filogenéticas, foi sugerida a transmissão de um astrovírus de suíno a gatos e depois a humanos, com um desconhecido hospedeiro intermediário potencialmente envolvido (LUKASHOV; GOUDSMIT, 2002). Outro estudo descreve a possível transmissão interespecie envolvendo astrovírus de humanos a suínos no Canadá (LUO et al., 2011), e a possibilidade de um ancestral comum entre astrovírus de rato (*RAsV*), de furão (*MiAsV*) e de ovelha (*OAsV*) e os astrovírus humanos *AstV-MLB* e *HMO-AstV*, os quais levantam questões sobre a possibilidade de possíveis emergências periódicas de transmissões zoonóticas dos astrovírus (KAPOOR et al., 2009; CHU et al., 2010).

3 OBJETIVOS

Este trabalho tem os seguintes objetivos:

- a. Diagnosticar a presença de astrovírus em amostras fecais de aves mediante o uso da técnica de RT-Hemi-nested-PCR direcionada ao gene *RdRp*, visando a detecção de vírus pertencentes a família *Astroviridae*.
- b. Confirmação dos achados e respectiva análise filogenética a partir da determinação da sequência de nucleotídeos dos produtos de Hemi-nested-PCR obtidos.
- c. Genotipagem das amostras triadas como positivas para o agente, mediante amplificação, sequenciamento e inferência filogenética do gene do capsídeo.
- d. Análise da diversidade das sequências virais definidas de modo a contribuir para o entendimento da epidemiologia das astroviroses.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS DE CAMPO

Foram utilizadas neste estudo 60 amostras fecais de aves de diversas idades oriundas de criações comerciais de frangos de corte, poedeiras e matrizes de diferentes estados brasileiros: São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais e Pernambuco, as quais foram colhidas durante os anos de 2013 a 2014. Estas amostras encontravam-se armazenadas a -80°C no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.2 EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Foram feitas suspensões fecais das amostras clínicas a 50% (p/v) em água tratada previamente com dietilpirocarbonato a 0,1% (DEPC) e posteriormente clarificadas por centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. De posse do sobrenadante, as extrações de RNA total foram feitas mediante o uso do reagente Trizol (*Invitrogen*[®]), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi ressuspenso em 25µL de água tratada com DEPC e mantido a -80°C até o seu processamento.

4.3 REAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO REVERSA

Para a síntese de cDNA, se procedeu à desnaturação a 95°C de 6 µL de RNA extraído (item 4.2) por 5 minutos e misturado a uma solução contendo 1x *First Strand Buffer* (*Invitrogen*[®]), 1mM de cada dNTP (*Invitrogen*[®]), 10mM DTT (*Invitrogen*[®]), 1pmol/µL de *random hexamers* (*Invitrogen*[®]), 1µL de *RNaseOUT* (*Recombinant RNase Inhibitor*, *Invitrogen*[®]) e 200U *SuperScript III Reverse Transcriptase* (*Invitrogen*[®]), para um volume

final de 20µL. A transcrição reversa foi realizada a 42°C/60 minutos.

4.4 REAÇÃO DE HEMI-NESTED PCR PARA A AMPLIFICAÇÃO DO GENE *RPRD*

Para a realização de PCR e Hemi-nested-PCR, foi utilizado o protocolo descrito por Chu et al. (2008), visando a amplificação de um fragmento do gene conservado *RdRp*, presente em todos os astrovírus reportados até o momento. As sequências dos *primers* utilizados na reação de PCR e Hemi-nested são descritas na Quadro 2.

Quadro 2 - Descrição dos *primers* usados para a detecção de astrovírus

Reação	Primer	Sequência do primer (5' - 3')	Pb ¹
PCR	Astro-Pan F11 (senso)	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA	560 bp
	Astro-Pan F12 (senso)	GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA	
	Astro-Pan R1 (antisenso)	GGYTTKACCCACATNCCRAA	
Hemi Nested PCR	Astro-Pan F21 (senso)	CGKTAYGATGGKACKATHCC	422 bp
	Astro-Pan F22 (senso)	AGGTAYGATGGKACKATHCC	
	Astro-Pan R1 (antisenso)	GGYTTKACCCACATNCCRAA	

¹ Pares de bases

Fonte: (CHU et al., 2008).

Na primeira amplificação, um total de 5µL de cDNA (item 4.3) foi adicionado a uma mistura de PCR contendo 3 diferentes *primers*, dois com polaridade senso (AstroPan F11 e AstroPan F12) e um antisenso (AstroPan R1), 1x PCR Buffer (*Invitrogen*®) cada um deles a 0,4pmol/µL; 0,2mM de cada dNTP (*Invitrogen*®); 3mM MgCl₂ (*Invitrogen*®); 1U de *Platinum Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen*®); e água tratada com DEPC para um volume final de reação igual a 25µL. A solução foi submetida a uma desnaturação inicial de 94°C por 60 segundos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 68°C por 30 segundos, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Segue-se a esta reação uma segunda amplificação de Hemi-nested-PCR, que por sua vez, utilizaram-se 3 *primers*, sendo dois deles com polaridade senso (AstroPan F21 e AstroPan F22) e o *primer* antisenso usado anteriormente (AstroPan R1). Esta reação visou a amplificação de um fragmento de 422 pb da região genica conservada *RdRp* localizada na

ORF1b. Para isto, foi adicionada a 2,5µL do produto obtido na primeira reação uma mistura contendo a mesma concentração de reagentes usados anteriormente e as mesmas temperaturas de amplificação.

4.5 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO

Todos os fragmentos obtidos das reações de Hemi-nested PCR (fragmento parcial do gene *ORF1b*) e outras reações de PCR (capsídeo viral) foram submetidos ao sequenciamento bidirecional de DNA. Os produtos de PCR foram purificados diretamente do tubo de reação usando o reagente *ExoSAP* (*USB® Products Affymetrix*), de acordo com o protocolo do fabricante.

A reação de sequenciamento consistiu em 2µL de *BigDye* (*BigDye® Terminator v3.1 Applied Biosystems*), 1,5µL de *5X Sequencing Buffer* (*BigDye® Terminator v3.1 Applied Biosystems*), 0,5 µM de cada *primer* senso e antisenso em reações separadas e 7µL do produto de PCR purificado previamente com *ExoSAP* (*USB® Products Affymetrix*). A mistura foi submetida a 35 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos, com uma rampa de 0,7°C/segundo entre cada temperatura.

Ao final, o produto da reação foi novamente purificado mediante o uso do Kit *Big Dye X-Terminator* (*Big Dye® X Terminator™ Purification Kit, Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante e aplicadas num sequenciador automático ABI Hitachi 3500 *Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*).

4.6 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Os cromatogramas das sequências genéticas foram verificados usando-se o software *FinchTV* v. 1.4 (*Geospiza Inc.*) e junto ao serviço BLAST/n do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmação da sua identidade. Além disso, as sequências homólogas e representativas dos astrovírus foram importadas no formato FASTA e alinhadas utilizando-se o programa *Bioedit* v. 7.1.11 (HALL, 1999).

As inferências filogenéticas para cada um dos genes pesquisados (*RdRp* e *ORF2*) foram feitas inicialmente através do cálculo da matriz de identidade de nucleotídeos utilizando-se o software *Bioedit* v. 7.1.11 (HALL, 1999). Para cada um dos conjuntos de sequências virais (as obtidas no presente trabalho e as anteriormente descritas no *GenBank*) foi feita a seleção do melhor modelo de substituição nucleotídica que melhor se adapte ao conjunto de dados, utilizando-se o software *jModelTest* v.2 (DARRIBA et al., 2012). As inferências filogenéticas foram obtidas usando o programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2011), através do método de máxima verossimilhança com um suporte estatístico dos ramos de 1.000 repetições de *bootstrap*.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE DE ASTROVÍRUS DETECTADA

A determinação da espécie de astrovírus (*ANV* ou *CAstV*) foi obtida mediante o sequenciamento e análise filogenética dos fragmentos gerados pela reação de Hemi-nested PCR, de acordo aos procedimentos descritos nos itens 4.5 e 4.6.

De posse dos cromatogramas gerados no sequenciamento e editadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.6, as sequências nucleotídicas foram alinhadas com sequências de referência recuperadas do *GenBank*, para cada uma das espécies reportadas de astrovírus aviário, discriminadas na Quadro 3.

Quadro 3 - Sequências de referência de cada uma das espécies de astrovírus aviário reportado na literatura, utilizadas para a determinação da espécie viral

Nome	<i>Acession code</i>	Espécie	Hospedeiro	Referência
<i>Duck Astrovirus C-NGB</i>	NC012437	<i>DAstV</i>	Pato	Fu et al. (2009)
<i>Turkey Astrovirus 2</i>	NC005790	<i>TAstV-2</i>	Peru	Koci et al. (2015)
<i>Avian Nephritis Virus</i>	NC003790	<i>ANV</i>	Frango	Imada et al. (2015)
<i>Turkey Astrovirus 1</i>	NC002470	<i>TAstV-1</i>	Peru	Jonassen et al. (2015)
<i>Avian Nephritis virus 1</i>	AB033998	<i>ANV</i>	Frango	Imada et al. (2006)
<i>Chicken Astrovirus GA2011</i>	JF414802	<i>CAstV</i>	Frango	Kang et al. (2012)

Fonte: (GUIX et al., 2013).

4.8 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *ORF2* NAS AMOSTRAS POSITIVAS PARA *AASTV*

Nas amostras positivas submetidas ao procedimento de determinação de espécie de astrovírus (item 4.7), foram realizadas adicionalmente outras reações de PCR visando amplificar o gene codificador do capsídeo viral, localizado na *ORF2*. Para este fim, foram usados *primers* específicos para cada espécie de astrovírus achado no presente estudo, de modo a se definir o genótipo encontrado, bem como a respectiva diversidade intragenotípica. Para isso, foram consideradas sequências de *primers* reportadas em outros trabalhos de pesquisa utilizadas para este fim e importadas sequências nucleotídicas disponíveis no *GenBank* (*ANV*, *CAstV* ou eventualmente outra espécie viral detectada) e alinhadas utilizando o programa *Bioedit* v. 7.1.11 (HALL, 1999). O desenho dos *primers* levou em consideração além da área consensual entre as amostras, os parâmetros de temperatura de *annealing* (T_m), conteúdo de GC, análise de possível formação de *hairpins*, dímeros (*self dimers*), sequências palíndromas e repetições de um mesmo nucleotídeo, avaliados pela aplicação *IDTDNA OligoAnalyzer* 3.1 (Disponível em <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).

4.8.1 Determinação da sequência do gene *ORF2*, codificadora do capsídeo viral, nas amostras positivas a astrovírus

As amostras de astrovírus detectadas foram caracterizadas quantos aos seus sete genótipos existentes dentro do gênero *Avastrovirus* (Quadro 4), mediante o emprego de uma reação de PCR que visou à amplificação do gene *ORF2*, purificação do fragmento a partir do gel, clonagem e posterior sequenciamento do gene completo, mediante o emprego da técnica de *Primer Walking* e composição subsequente do gene inteiro.

Quadro 4 - Sequências de referência para determinação dos sete genótipos de *Avastrovirus* mediante análise do gene do capsídeo

Genótipo	Code access	Hospedeiro	Referência
<i>AAstV-1</i>	Y15936	Peru	Jonassen et al. 2012
<i>AAstV-2</i>	AB033998 (ANV-1)	Frango	Imada et al.2006
	AB046864 (ANV-2)		
<i>AAstV-3</i>	AY769615	Peru	Tang et al. 2005
	AY769616	Galinha d'angola	
	FJ434664	Pato	Fu et al. 2012
<i>AAstV-4</i>	JF414802	Frango	Kang et al. 2012
<i>AAstV-5</i>	HQ889774	Pombo	Zhao et al. 2011
	HM029238	Frango	Zhao et al., 2011
<i>AAstV-6</i>	FR727149	Pombo torcaz	Kofstad et al. 2011 ¹
<i>AAstV-7</i>	FR727146	Pombo	Kofstad et al. 2011 ¹
	FR727147		
	FR727148		

¹Não publicado

4.8.2 Amplificação do gene *ORF2* nas amostras positivas a espécie *Avastrovírus 2* (*Avian Nephritis Virus*, *ANV*), *Chicken Astrovírus* (*CAstV*) e *Avastrovírus 1* (*Turkey Astrovírus* tipo 1, *TAstV-1*)

Para a realização deste procedimento usou-se protocolos descritos previamente na literatura (em casos das amostras positivas a *ANV* e *CAstV*) ou procedeu-se ao teste de novos protocolos (amostras positivas para *TAstV-1*).

Nas amostras positivas a *ANV*, usou-se o protocolo descrito por Todd et al. (2011), mediante o uso de *primers* as quais foram sintetizados visando a amplificação dos dois sorotipos existentes de *ANV*, *ANV-1* e *ANV-2*. Os *primers* *ANV* PreCAP (senso) e *ANV* PostCAP (antisenso), descritos na Quadro 5, foram usados para a amplificação de fragmentos de 2,5 kb, correspondente ao tamanho aproximado do gene *ORF2*, mais segmentos parciais do gene *ORF1* e *UTR*. Para isto, o DNAc obtido anteriormente e usado na primeira triagem, foi acrescentado a uma mistura de PCR contendo *Buffer* PCR 1X (*Invitrogen*®), 2,0mM de $MgCl_2$ (*Invitrogen*®), 1,25mM de dNTPs (*Invitrogen*®), 1µM de cada *primer* senso e antisenso, 1U de *Taq polimerase* (*Invitrogen*®) e água DEPC para um volume final de 25µL. A afinidade e localização dos *primers* nas sequências de *ANV* estão apresentadas na Figura 5.

Usou-se uma amplificação de tipo *Long Range PCR*, (devido a necessidade de amplificação de um fragmento de 2,5 kb) onde as temperaturas usadas foram: 94°C por 4 minutos, 25 ciclos de 94°C por 15 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos com 30 segundos e 15 ciclos de 94°C por 15 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos com 30 segundos, no qual o tempo de extensão foi sendo incrementada em 15 segundos em cada ciclo e finalmente 72°C por 10 minutos como extensão final. Posteriormente realizou-se uma eletroforese em gel de agarose ao 2% corado com SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (*Invitrogen*®) (de acordo com as especificações do fabricante) e usando um marcador *ladder* de 1 kb (1kb *Plus DNA Ladder*, *Invitrogen*®).

Nas amostras positivas a *CAstV*, usou-se o protocolo descrito por Smyth et al. (2011), usando os *primers* *CAstV* PreCAP senso e *CAstV* PostCAP antisenso descritos no Tabela 5 e na Figura 6. As características da reação foram as seguintes: *Buffer* PCR 1X (*Invitrogen*®), 2mM de $MgCl_2$ (*Invitrogen*®), 1,25mM de dNTPs (*Invitrogen*®), 1µM de cada *primer* senso e antisenso, 1U de *Taq polimerase* (*Invitrogen*®) e água DEPC para um volume final de 25 µL. Também foi usada uma amplificação de tipo *Long Range PCR*, onde as temperaturas foram as seguintes: 94°C por 4 minutos, 25 ciclos de 94°C por 15 segundos, 50°C por 30 segundos e

72°C por 2 minutos com 30 segundos e 15 ciclos de 94°C por 15 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos com 30 segundos, na qual o tempo de extensão foi incrementado 15 segundos em cada ciclo e finalmente 72°C por 10 minutos como extensão final. Posteriormente realizou-se uma eletroforese em gel de agarose ao 2% corado com SYBR[®] *Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen[®]) (de acordo com as especificações do fabricante) e usando um marcador *ladder* de 1 kb (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen[®]).

Nas amostras positivas a *TAsV-1*, usou-se um protocolo feito neste trabalho, isto é devido a pouca informação existente sobre este vírus, tanto sobre protocolos de amplificação do gene *ORF2*, assim como informação genética disponível no *GenBank*.

Foi desenhado um par de *primers*, usando como referência para determinação das sequências a única sequência disponível de *TAsV-1*, codificado como NC002470 no *GenBank*, publicado por Jonassen et al. (2015) (Figura 7). Os *primers* desenhados para este fim, *TAsV PreCAP* (senso) e *TAsV PostCAP* (antisenso) (Tabela 4), foram usados na seguinte reação de PCR: *Buffer PCR 1X* (Invitrogen[®]), 2mM de $MgCl_2$ (Invitrogen[®]), 1,25mM de dNTPs (Invitrogen[®]), 1µM de cada *primer* senso e antisenso, 1U de *Taq polimerase* (Invitrogen[®]) e água DEPC ate chegar a um volume final de 25µL. Foi usada também uma amplificação de tipo *Long Range PCR*, onde as temperaturas foram as seguintes: 94°C por 4 minutos, 25 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos com 30 segundos e 15 ciclos de 94°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos com 30 segundos, no qual o tempo de extensão foi incrementado 15 segundos a cada ciclo e finalmente 72°C por 10 minutos como extensão final. Posteriormente realizou-se uma eletroforese em gel de agarose á 2% corado com SYBR[®] *Safe DNA gel Stain* (Invitrogen[®]) (de acordo com as especificações do fabricante) e usando um marcador *ladder* de 1 kb (1kb *Plus DNA Ladder*, Invitrogen[®]).

Quadro 5 - Sequência de primers usados na amplificação do gene *ORF2* em astrovírus

<i>Primers</i>	Sequência 5' – 3'	Tamanho (bp)	Ref.
ANV PreCAP	ACCTTGAATCCCTGTGGGGCA	2500	Todd et al. (2011)
ANV PostCAP	AAAAGTTAGCCAATTCAAAATTAATTC		
CAstV PreCAP	TAGAGGGATGGACCGAAATATAGCAGC	2500	Smyth et al. (2012)
CAstV PostCAP	TGCAGCTGTACCCTCGATCCTA		
TAstV PreCAP	CGCCATGCCAAGGAAGCCGGC	2030	Este estudo
TAstV PostCAP	TCGATCCTACCCGGCGTGGCC		

Fonte: (TODD et al., 2011; SMYTH et al., 2012).

Figura 5 - Localização dos *primers* senso ANV preCAP e antisenso ANV postCAP (TODD et al. 2011)

Fonte: (LUNA, 2016).

Figura 6 - Localização dos *primers* CAstV PreCAP e CAstV PostCAP (SMYTH et al., 2011) em diversas sequências de CAstVs

Fonte: (LUNA, 2016).

Figura 7 - Localização dos *primers* senso (A) e antisense (B) no genoma de TAsTV-1 (Accession number NC002470)

Fonte: (LUNA, 2016).

4.8.3 Purificação dos fragmentos de 2,5 kb do gel

Para a realização deste procedimento, usou-se o kit *GeneJET Gel Extraction Kit* (*Thermo Scientific*TM), na qual, depois de realizada a eletroforese dos fragmentos de PCR, realizou-se a excisão do fragmento de 2,5 kb do gel, usando um bisturi e com ajuda de um Transluminador UV. O gel contendo o fragmento foi purificado usando o kit de acordo com as instruções do fabricante. Quantificou-se o fragmento purificado mediante o uso do espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (*Thermo Scientific*TM).

4.8.4 Clonagem

Para a realização da clonagem do produto de PCR purificado previamente (item 4.8.3) usou-se o Kit *InsTAclone PCR Cloning Kit* (*Thermo Scientific*TM). O kit provê como vetor de clonagem o plasmídeo *pTZ57R/T*. A composição do plasmídeo está descritas na Quadro 6 e Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática do plasmídeo vetor *pTZ57R/T*

Fonte: (www.snapgene.com).

Quadro 6 - Constituição do vetor de clonagem *pTZ57R/T*

Elemento	Função	Posição (bp)
<i>rep (pMB1)</i>	Um replicom (rep) do plasmídeo <i>pMB1</i> que es responsável pela replicação	1122 - 1736
<i>Replication start</i>	Iniciação da replicação	1136 (±1)
<i>bla (Ap^R)</i>	Gene β-lactamase que confere resistência à ampicilina, para seleção e mantimento de células de <i>E. coli</i> recombinantes	1896-2756
<i>LacZ α-peptide</i>	<i>Screening</i> de clones recombinantes azuis / brancos	449 – 749
<i>Multiple cloning site</i>	Mapeamento, <i>screening</i> e excisão dos clones inseridos.	615 - 695
<i>Cloning site</i>	Cauda 3'- <i>ddt</i> para ligação com o inserto	650 - 651
<i>Phage f1 origin</i>	Síntese de uma fita simples de DNA	2 - 457
<i>T7 promoter</i>	Transcrição in vitro do inserto de DNA com polimerase T7 RNA	697 - 716
<i>M13/pUC forward sequencing primer</i>	Sequenciamento do inserto	599 - 614
<i>M13/pUC reverse sequencing primer</i>	Sequenciamento do inserto	735 - 751
<i>T7 promoter sequencing primer</i>	Sequenciamento do inserto	697 - 716

Fonte: (www.thermofisher.com).

Como primeiro procedimento da clonagem foi a realização da reação de ligação, visando à ligação do inserto (ou produto de PCR) a um plasmídeo vetor. Para o cálculo das quantidades ótimas do inserto e concentrações de cada componente da reação de ligação, foi usada a seguinte formula:

$$\text{Quantidade (ng) do inserto} = \frac{\text{Quantidade (ng) do plasmídeo vetor} \times \text{tamanho do fragmento (pb)}}{\text{Tamanho do plasmídeo vetor (pb)}}$$

A mistura da reação de ligação foi composta de: 4µL de *Buffer* de ligação 5X (*Thermo Scientific*TM), inserto ou produto de PCR na concentração ótima, 1µL de Plasmídeo Vetor (55 ng/ µL) (*Thermo Scientific*TM) e 1µL de T4 DNA ligase (5U/µL) (*Thermo Scientific*TM), colocados na mistura de reação estritamente nessa ordem, feito numa base refrigerada e posteriormente incubadas a 14-16°C por 16 horas.

O segundo procedimento da clonagem consistiu na transferência do plasmídeo vetor com o produto de PCR inserido numa célula receptora competente (transformação física química) por choque térmico. Para isso, usou-se a cepa competente de *E. coli* JM 109 (a uma concentração de 10⁸ ufc / 100µL). Este processo é feito misturando-se a reação de ligação com as células competentes de *E. coli*, colocados numa base de gelo, deixando incubando por 30 minutos no gelo, para depois colocar a 42°C, para provocar um choque térmico, por 1,5 minutos. Neste passo, o vetor com o inserto foi introduzido na célula bacteriana por permeabilidade da membrana celular a 42°C, e posterior impermeabilização mediante incubação por 2 minutos em gelo. Uma vez terminado este processo, acrescentou-se na mistura de células com a reação de ligação, 900µL de meio de cultura liquido LB (DifcoTM LB *Broth*, Miller, Luria Bertani, *Becton Dickinson*TM), e incubadas a 37°C em agitação constante durante duas horas. Posteriormente, se tomou uma alíquota de 150µL desta mistura, e com a ajuda de uma alça semeou-se em placas de Agar LB (DifcoTM LB *Agar*, Miller, Luria Bertani, *Becton Dickinson*TM), as quais previamente foi adicionada ampicilina sódica a uma concentração de 1µL/ml de meio de cultura, 25µL de IPTG (isopropil-β-D-Thiogalactopiranoside) a uma concentração de 24µg/µL e 20µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranoside) a uma concentração de 20µg/µL diluído em N,N dimetilformamida. As placas foram incubadas por 12-14 horas a 37°C em uma estufa.

4.8.4.1 Seleção das colônias de *E.coli* com os plasmídeos recombinantes

A identificação e seleção das colônias de *E. coli* que adquiriram o plasmídeo com o inserto foi realizado mediante dois testes. O primeiro teste foi a capacidade da bactéria para se replicar em meio de cultura com ampicilina, indicando que a célula contém o vetor, que tem um gene que codifica para uma β -lactamase. Este filtro permite apenas identificar as células que adquiriram o plasmídeo, já a identificação das colônias que adquiriram o plasmídeo como o inserto se realizou da seguinte maneira. O gene *LacZ*, presente no vetor, está localizado na região de inserção (Figura 8), portanto a ligação do inserto de interesse no vetor fará que a bactéria sintetize uma proteína lactase não funcional, o que impedirá a degradação dos compostos de galactosidases (X Gal) presentes no meio fazendo que a colônia fique com uma coloração branca. Já aquelas colônias com vetores que não tem o inserto foram capazes de sintetizar a enzima lactase funcional, degradando o X Gal presente no meio, gerando colônias de cor azul. O processo total de clonagem é representado esquematicamente na Figura 9.

Figura 9 - Representação esquemática do processo de clonagem

Fonte: (LUNA, 2016).

4.8.4.2. Sequenciamento dos clones

As colônias brancas selecionadas passaram por uma última etapa de verificação da presença do inserto, para isto se realizou uma PCR usando como *primers* as sequências flanqueantes da região do inserto denominadas M13 *forward* (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') e M13 *reverse* (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (Figura 8 e Tabela 6). As condições de reação para esta PCR foram as seguintes: 2µL de *Buffer* PCR 10X, 0,8µL de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1U de *Taq polimerase* (*Invitrogen*[®]) e uma pequena alíquota de colônia colocada no tubo com a ajuda de um palito de madeira estéril. As temperaturas de amplificação foram 94°C por 10 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 3 minutos e finalmente 72°C por 7 minutos. Foi feita a eletroforese em gel de agarose ao 2% corado com SYBR[®] *Safe DNA Gel Stain* (*Invitrogen*[®]) (de acordo com as especificações do fabricante) e usando um *ladder* de 1kb (1 kb *Plus DNA ladder*, *Invitrogen*[®]). Na visualização, o tamanho da banda da colônia com o plasmídeo recombinante é 157 pb mais o tamanho do inserto.

As colônias selecionadas confirmadas com o plasmídeo recombinante foram semeadas em caldo LB (DifcoTM *LB Broth*, Miller, Luria Bertani, *Becton Dickinson*TM) adicionado com ampicilina (1µL/ml), e incubadas a 37°C por 12 horas em agitação constante. Posteriormente, procedeu-se extração e purificação de plasmídeos usando o kit *NucleoSpin Plasmid* (*Macherey Nagel*TM), seguindo as instruções do fabricante. Os plasmídeos purificados foram quantificados usando o espectrofotômetro *NanoDrop* ND-1000 (*Thermo Scientific*TM). e posteriormente passaram para a realização de reação de sequenciamento, usando para isto as condições descritas no item 4.5, exceto que foram usados neste processo os *primers* M13 *forward* e *reverse*.

Foram sequenciados 4 a 6 clones por amostra, dependendo da quantidade de colônias brancas presentes na placa de ágar.

4.8.5 *Primer Walking*

Através da estratégia de *Primer Walking* (JONES; WINISTORFER, 1992) foi sequenciado completamente o gene *ORF2*. Depois de ser realizado o primeiro sequenciamento dos clones com os *primers* M13, foram desenhados novos *primers* (*forward* e *reverse*) tomando em conta os extremos destas sequências obtidas com o fim de que todo o fragmento amplificado fosse sequenciado, formando um único *contig*. Para isto foram desenhados e testados vários *primers*, até que todo o gene de todos os clones fossem sequenciados. Os *primers* usados constam no Quadro 7 e representados esquematicamente nas Figuras 10, 11 e 12.

Quadro 7 - *Primers* desenhados neste estudo e usados para o sequenciamento completo da sequência do gene *ORF2*

Primer	Sequência (5' – 3')	Posição no gene <i>ORF2</i>	Espécie
ANV interCAPF	TCKCARTCRCCDGCTGA	582 - 599	ANV
ANV interCAPR	GTGTCNSTVRYRTYTTGCATTTG	1711 - 1734	
ANV interCF	TCGCCWGCAGATKCGTATGG	587 - 607	
ANV interCR	TGCATTTGRAGAAARTAGTC	1698 - 1718	
CAstV interCAPF	TWYTRMGAGGTGGCTGGTGGGT	1048 - 1069	CAstV
CAstV interCAPR	TGTTTTTGCTGCTCAGGTCC	2179 - 2198	

Fonte: (LUNA, 2016).

Figura 10 - Posições dos *primers* senso ANV interCAPF (azul) e ANV interCF (vermelho) dentro das sequências parciais do gene das amostras sequenciadas. Observa-se a afinidade parcial dos *primers* para as amostras de *ORF2*

	580	590	600	610	620
5-1 capsid	TTATTGACACCTCGCAATCACC	GGCCGACTCATACGGACCTG	CCGTCGATTGTCT		
5-2 capsid	TTATTGACACCTCGCAATCACC	GGCCGACTCATACGGACCTG	CCGTCGATTGTCT		
5-3 capsid	TTACAGATACGTCAAGCTCACC	GGCTGACGATATGGGCCGTG	CAGTCGATCTGAT		
5-4 capsid	TTACAGATACGTCAAGCTCACC	GGCTGACGATATGGGCCGTG	CAGTCGATCTGAT		
19-1 capsid	TCACTGATACCTTCGCAATCG	CCAGCTGACTCCTATGGACC	GGCAATTGACCTAAT		
19-2 capsid	TCATCGATACCTTCGCAATCG	CCAGCTGACTCCTATGGACC	GGCAATTGACCTAAT		
19-4 capsid	TTACTGATACGTCTCAGTCACC	AGCTGACTCCTATGGACC	GGCAATTGACCTAAT		
19-5 capsid	TCATCGATACCTTCGCAATCG	CCAGCTGACTCCTATGGACC	GGCAATTGACCTAAT		
45-2 capsid	TTACTGATACCTTCACAGTCT	CCCGCTGATGCATACGGACC	GGCGGTTGATCTTAT		
45-3 capsid	TTACTGATACATCGCAGTCACC	GGCTGATTCATATGGACC	GGCAATTGATCTTAT		
45-4 capsid	TTACTGATACCTTCACAGTCT	CCCGCTGATGCATACGGACC	GGCGGTTGATCTTAT		
45-6 capsid	TTACTGATACATCGCAGTCACC	GGCTGATTCATATGGACC	GGCAATTGATCTTAT		
46-1 capsid	TTACTGATACCTTCACAGTCT	CCCGCTGATGCATATGGACC	GGCGGTTGATCTTAT		
46-2 capsid	T- ACTGATACCTTCACAGTCT	CCCGCTGATGCATATGGACC	GGCGGTTGATCTTAT		
46-4 capsid	TTACTGATACCTTCACAGTCT	CCCGCTGATGCATATGGACC	GGCGGTTGATCTTAT		
46-5 capsid	TTACTGATACCTTCACAGTCT	CCCGCTGATGCATATGGACC	GGCGGTTGATCTTAT		
48-1 capsid	TCACCGACACTTCGCAATCG	CCAGCTGATGCATACGGACC	GGCGGTAGACCTTAT		
48-5 capsid	TCATCGATACCTTCGCAATCG	CCAGCTGATGCATACGGACC	GGCGGTAGACCTTAT		
48-7 capsid	TCACTGACACTTCGCAATCG	CCAGCTGATGCATACGGACC	GGCGGTAGACCTTAT		
48-9 capsid	TCATCGATACCTTCGCAATCG	CCAGCTGATGCATACGGACC	GGCGGTAGACCTTAT		
57-1 capsid	TCATTGATACCTCTCAATCACC	AGCTGATTCCTACGGACC	GGCCATTGATTGCC		
57-3 capsid	TTACTGATACATCTCAGTCAAC	GGCTGATTCATACGGGCC	AGCAATCGATCTTAT		
57-5 capsid	TTACCGATACGTTCGCAATCACC	AGCTGAATCCTATGGACC	GGCTATTGACCTAAT		
57-9 capsid	TCATTGATACCTCCCAATCACA	AGCTGATCCCTACGGACC	GGCCATTGATTGCC		
55-4 capsid	TTACTGATACCTTCACAGTCA	CCGGCCGACTCTTATGGGCC	AGCAATCGATCTTAT		
55-5 capsid	TTACCGATACGTTCGCAATCACC	AGCTGAATCCTATGGACC	GGCTATTGACCTAAT		
59-3 capsid	TTACTGATACATCGCAGTCACC	GGCTGATTCATATGGACC	GGCAATTGATCTTAT		
59-5 capsid	TTACTGATACCTTCACAGTCA	CCGGCCGACTCTTATGGGCC	AGCAATCGATCTTAT		

Fonte: (LUNA, 2016).

Figura 11 - Posições dos *primers* antisense ANV interCAPR (vermelho) e ANV interCR (azul) (Reverso complemento da sequência do primer). Observe-se a afinidades parciais dos *primers* para as amostras de *ORF2*

	1710	1720	1730	1740	1750
5-1 capsid	TTGGTGGCTA	CAAATGCAAAACACCAC	TGACACGCGAACACACACCG	TCGCAACA	
5-2 capsid	TTGGTGGCTA	CAAATGCAAAACACCAC	TGACACGCGAACACACACCG	TCGCAACA	
5-3 capsid	TTGGTTTCTT	CAGATGCAGAACGTTGGT	GACTATACAACACACACCAC	GTCCAGTT	
5-4 capsid	TTGGTTTCTT	CAGATGCAGAACGTTGGT	GACTATACAACACACACCAC	GTCCAGTT	
19-1 capsid	TTACTTCCTG	CAAATGCAAGATACTACT	GACACCACCGTCCACAGT	TACATCAGTT	
19-2 capsid	CTGGTATGTT	CAAATGCAAGATGTGAG	CGACACTCAAACACACAC	CAGGCAACA	
19-4 capsid	TTGGTTTCTT	CGAATGCAAGATGTACAG	ACACTGTACACACACCA	ACTGTGTC	
19-5 capsid	CTGGTATGTT	CAAATGCAAGATGTGAG	CGACACTCAAACACACAC	CAGGCAACA	
45-2 capsid	TCTTTACATT	CAAATGCAAGCAGTGAC	GGACAAATCAACCAGAACT	TACATCCACT	
45-3 capsid	CTGGTGGTTA	CAGATGCAAAAAGTTGGT	GATACCACTTCCCCACACA	ACCCAGTT	
45-4 capsid	TCTTTACATT	CAAATGCAAGCAGTGAC	GGACAAATCAACCAGAACT	TACATCCACT	
45-6 capsid	CTGGTGGTTA	CAAATGCAAAAAGTTGGT	GATACCACTTCCACACA	ACCCAGTTGG	
46-1 capsid	TCTCTATCTT	CAAATGCAAGCTGTCACT	GACAACTCAACTAGAACT	TACATCCACT	
46-2 capsid	TCTCTATCTT	CAAATGCAAGCTGTCACT	GACAACTCAACTAGAACT	TACATCCACT	
46-4 capsid	TCTCTATCTT	CAAATGCAAGCTGTCACT	GACAACTCAACTAGAACT	TACATCCACT	
46-5 capsid	TCTCTATCTT	CAAATGCAAGCTGTCACT	GACAACTCAACTAGAACT	TACATCCACT	
48-1 capsid	TTACTTCCTG	CAAATGCAAGATACTACT	GACACAACCGTCCACAGT	TACATCAGTT	
48-5 capsid	CTGGTATGGT	CAAATGCAAGATGTGAG	CGACACTCAAACACACAC	CAGGCAACA	
48-7 capsid	ATACTTCCTG	CAAATGCAAGATACTACT	GACACAACGCTCCACAGT	TACATCAGT	
48-9 capsid	CTGGTATGTT	CAAATGCAAGATGTGAG	CGACACTCAAACACACAC	CAGGCAACA	
57-1 capsid	CTGGTGGTTA	CAAATGCAAAACACCAC	TGACACCCGAACACACACCG	TCGCAACA	
57-3 capsid	CTGGTGGCTT	CAAATGCAAAACATCAC	GGACACCCTTCCCGCAG	CACCTGTGTC	
57-5 capsid	TTGGTTTCTT	CAAATGCAAGATGTCAC	AGACACTGTACACATAC	CAACTGTGTC	
57-9 capsid	CTGGTGGTTA	CAAATGCAAAACACCAC	TGACACCCGAACACACACCG	TCGCAACA	
55-4 capsid	CTGGTGGCTG	CAGATGCAAAAAGTGGGT	GACACAACATCCCCACACA	ACCCAGTT	
55-5 capsid	TTGGTTTCTT	CAAATGCAAGATGTCAC	AGACACTGTACACATAC	TAAGTGTGTC	
59-3 capsid	CTGGTGGCTG	CAGATGCAAAAAGTGGGT	GACACAACATCCCCACACA	ACCCAGTT	
59-5 capsid	CTGGTGGCTG	CAGATGCAAAAAGTGGGT	GACACAACATCCCCACACA	ACCCAGTT	

Fonte: (LUNA, 2016).

Estes *primers* foram colocados diretamente na mistura de reação de sequenciamento, de acordo com o item 4.5, e as sequências foram editadas e processadas de acordo ao descrito com o item 4.6.

Figura 12 - Posições dos *primers* senso CAsV interCAPF (retângulo azul) e CAsV interCAPR (retângulo vermelho) na sequência de *ORF2* da cepa de CAsV detectada neste estudo

Fonte: (LUNA, 2016).

4.8.6 Determinação dos genótipos das sequências de astrovírus aviário

A determinação dos genótipos de astrovírus foi realizada mediante o sequenciamento e análise filogenética da sequência deduzida de aminoácidos do gene *ORF2* codificador do capsídeo obtido pelos procedimentos descritos nos itens 4.5.

De posse com os cromatogramas gerados no sequenciamento e editadas de acordo com o procedimento descrito no item 4.6, foram alinhadas e analisadas filogeneticamente com sequências de referência recuperadas do *GenBank*, para cada uma das genótipos relatados de Astrovírus aviário (GUIX; BOSCH; PINTÓ, 2013), cujas sequências estão descritas na tabela 4.

A designação e/ou classificação de cada sequência dentro de um determinado genótipo baseia se nos critérios propostos pelo *Astroviridae Study Group* (BOSCH et al., 2010b), na qual a distância média de aminoácidos (distância-p) está entre e dentro dos genótipos num intervalo de 0,414-0,728 e 0,047-0,299, respectivamente. Mediante o cálculo da distância-p e a análise filogenética, usando sequências de referência para cada genótipo (Quadro 4), determinou-se o genótipo para cada amostra.

4.8.7 Análise de diversidade das amostras de astrovírus

De posse com as sequências completas do gene *ORF2* do capsídeo viral, estas foram analisadas mediante análise filogenética usando diversas sequências de *ORF2* disponíveis no *GenBank*, (Quadro 8) visando analisar a semelhança e a divergência das amostras deste estudo com amostras de outros países, tentando estabelecer um nexos epidemiológico entre elas. Como no anterior caso, foram usadas as sequências deduzidas de aminoácidos do gene *ORF2*.

Quadro 8 - Sequências exportadas do *GenBank* para a análise filogenética de diversidade baseada no gene codificante do capsídeo viral. Apresentam-se as sequências de origem europeia e asiática

(Continua)

<i>Accession number</i>	<i>Nome da cepa</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>País</i>	<i>Referência</i>
HQ330504	ANV-VF08-65	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330499	ANV-VF08-53	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330498	ANV-VF08-18/16	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330482	ANV-VF07-13/7	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330502	ANV-VF08-52	Frango	UK	Todd et al. 2011
KM985695	NSW-4b	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
HQ330501	ANV-VF08-21	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330500	ANV-VF08-22	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330490	ANV-VF08-18/5	Frango	UK	Todd et al. 2011
KM985703	VIC-6b	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
KM985700	VIC-5b	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
HQ330487	ANV-VF05-1/5	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330483	ANV-VF08-3a	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330489	ANV-VF08-18/14	Frango	UK	Todd et al. 2011
AB046864	ANV-2	Frango	Japão	Chamings et al. 2015
HQ330503	ANV-VF08-39	Frango	UK	Todd et al. 2011
KM985697	VIC-3b	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015

(Conclusão)

<i>Accession number</i>	<i>Nome da cepa</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>País</i>	<i>Referência</i>
KM985698	VIC-3c	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
KM985696	VIC-3a	Frango	Austrália	Chamings(continuação)
KM985694	NSW-4a	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
HQ330497	ANV-05V0105	Frango	Alemanha	Chamings et al. 2015
HQ330496	ANV-06V0062	Frango	Alemanha	Todd et al. 2011
HQ330493	ANV-VF05-1/8	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330495	ANV-VF06-01/4	Frango	UK	Todd et al. 2011
HQ330481	ANV-VF04-1/2	Frango	UK	Todd et al. 2011
KM985702	VIC-6a	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
KM985690	NSW-1a	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
HQ330488	ANV-VF08-3b	Frango	UK	Todd et al. 2011
KM985691	NSW-1b	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
KM985692	NSW-3a	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
KM985699	VIC-5a	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
KM985701	VIC-5c	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
HM029238	ANV-1	Frango	China	Zhao et al., 2011
JF422783	Pigeon/CHN-10/2010	Pombo	China	Zhao et al., 2011
HQ889774	Pigeon ANV SH10	Pombo	China	Zhao et al., 2011
HQ330505	ANV-VF08-60	Frango	UK	Todd et al. 2011
KM985693	NSW-3b	Frango	Austrália	Chamings et al. 2015
HQ330491	ANV-VF08-29a	Frango	UK	Todd et al. 2011
AB033998	ANV-1	Frango	Japão	Imada et al. 2006
HQ330484	ANV-EF91-276-C15	Frango	UK	Todd et al. 2011

Fonte: (GenBank).

5 RESULTADOS

5.1 DIAGNÓSTICO DE ASTROVÍRUS NAS AMOSTRAS FECAIS

Das 60 amostras de fezes testadas pela reação de Hemi-nested PCR, foram positivas para astrovírus um total de 29 (48,3%). Estes resultados são apresentados na Tabela 1, identificando o número, a procedência e o tipo de criação destas amostras positivas.

Tabela 1 - Amostras positivas a astrovírus por estado e tipo de criação

Estado	Tipo de criação	Amostras positivas (%)
São Paulo	Postura comercial	1/29 (3%)
Rio Grande do Sul	Matriz Frango de corte	5/29 (17%)
	Frango de corte	8/29 (27%)
	Postura comercial	5/29 (17%)
Paraná	Frango de corte	4/29 (14%)
	Postura comercial	1/29 (3%)
Mato Grosso do Sul	Postura comercial	2/29 (7%)
Pernambuco	Postura comercial	2/29 (7%)
Minas Gerais	Postura comercial	1/29 (3%)

Fonte: (LUNA, 2016).

5.2 DETERMINAÇÃO DA ESPÉCIE DE ASTROVÍRUS MEDIANTE SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE UM FRAGMENTO DO GENE *ORF1B*

Foram definidas as sequências parciais e realizada a análise filogenética do fragmento gênico *RdRp*, localizado na *ORF1b*, nas 29 amostras detectadas por Hemi-nested PCR. Portanto, foi possível definir a espécie de astrovírus detectada em cada amostra positiva.

Para a realização da árvore filogenética, foram usadas as 29 sequências obtidas do sequenciamento parcial do gene *RdRp*, mais as sequências de referência descritas na Quadro 1. Para este fim usou-se o método de construção filogenética de Máxima Verossimilhança (*Maximum likelihood*), usando o modelo de substituição Tamura 3 parâmetros (T92), com um valor de Gama de 0,52, e um *bootstrap* de 1.000 repetições.

A análise filogenética mostrou a formação de três clusters de amostras, 21 de elas agrupadas com as sequências de referência NC003790 e AB033998 (pertencentes à espécie *Avastrovírus* 2), 6 amostras agrupadas com a sequência de referência NC002470 (correspondente a espécie *Avastrovírus* 1) e duas amostras agrupadas com a sequência de referência JF414802 (correspondente a *Chicken Astrovírus*, *CAstV*) (Figura 13).

De acordo com a *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2014), são reconhecidas três espécies de *Avastrovírus*, das 29 amostras positivas a Astrovírus, 21 corresponderam a espécie *Avastrovírus* 2 (correspondente a *Avian Nephritis Virus*, ANV), 6 amostras corresponderam a espécie *Avastrovírus* 1 (correspondente a *Turkey Astrovírus* tipo 1, *TAsV-1*) e 2 amostras corresponderam a *Chicken Astrovírus*, *CAstV*, (sem espécie definida segundo a ICTV, mas dentro do gênero *Avastrovírus*) (Tabela 2).

Figura 13 - Árvore filogenética construída com o método Máxima Verossimilhança, através do modelo de substituição Tamura 3 parâmetros para a região parcial (370 nucleotídeos) do gene *RdRp* do *ORF1b* dos astrovírus. As amostras deste estudo foram marcadas com um triângulo preto. Os números próximos a cada nó representam os valores de *bootstrap* de 1.000 repetições, sendo mostradas apenas aquelas maiores a 60%. A escala representa o número de substituições / sítio

Fonte: (LUNA, 2016).

Tabela 2 - Espécies de astrovírus detectados de acordo com o tipo de criação e estado de procedência

Espécie	Estado	n	Tipo de criação	n
ANV	São Paulo	1	Poedeiras	1
	Rio Grande do Sul	12	Matriz de frango de corte	4
			Postura comercial	4
			Frango de corte	4
	Paraná	4	Frango de corte	3
			Postura comercial	1
	Mato Grosso	1	Poedeiras	1
	Pernambuco	2	Postura comercial	2
	Minas Gerais	1	Postura comercial	1
CAstV	Rio Grande do Sul	2	Matriz de frango de corte	1
			Postura comercial	1
TAstV-1	Mato Grosso do Sul	1	Postura comercial	1
	Rio Grande do Sul	4	Frango de corte	4
	Paraná	1	Frango de corte	1

Fonte: (LUNA, 2016).

5.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *ORF2* NAS AMOSTRAS POSITIVAS A ASTROVÍRUS

5.3.1 Amostras positivas para a espécie *Avastrovírus 2* (ANV)

Das 21 amostras positivas para ANV, oito amostras foram amplificadas usando os *primers* descritos por Todd et al. (2011). Todos os clones gerados das oito amostras puderam ser sequenciados, aliado ao fato de ter sido possível observar a presença de mais de uma cepa de ANV infectando uma mesma amostra na maioria das que foram submetidas à clonagem (Quadro 9). A distribuição das sequências de *ORF2* de ANV segundo a localização geográfica foi aleatória, não mostrando algum padrão definido (Figura 14).

Quadro 9 - Amostras positivas empregando-se os *primers* dirigidos para *ORF2*, clonadas e sequenciadas para o capsídeo viral

Código amostra	Clones	Procedência	Tipo de criação
Avian AstV Brasil 57	4	Paraná	Postura Comercial
Avian AstV Brasil 55	2	Rio Grande do Sul	Frango de corte
Avian AstV Brasil 59	2	Rio Grande do Sul	Frango de Corte
Avian AstV Brasil 45	4	Rio Grande do Sul	Postura comercial
Avian AstV Brasil 5	4	Rio Grande do Sul	Matriz de frango de corte
Avian AstV Brasil 48	4	Rio Grande do Sul	Postura comercial
Avian AstV Brasil 19	4	Paraná	Frango de corte
Avian AstV Brasil 46	4	Rio Grande do Sul	Matriz de frango de corte

Fonte: (LUNA, 2016).

Figura 14- Árvore filogenética de Máxima Verossimilhança e modelo de substituição TN93 G+I, com apenas as sequências de *ORF2* de ANV deste estudo, segundo localização geográfica

Fonte: (LUNA, 2016).

5.3.2 Análises da sequência *ORF2* nas cepas de ANV

5.3.2.1 Características gerais das sequências preditas do gene *ORF2*

A poliproteína *ORF2* mostra uma alta variabilidade entre proteínas dos ANV, tendo uma variação de 2004 até 2049 nt em termos de nucleotídeos e 667 até 683 para a sequência de aminoácidos. Foi observada uma região N-terminal relativamente mais conservada em relação à região C-terminal, corroborado com a presença de segmentos de sequências comuns entre espécies de astrovírus (Figura 15).

5.3.2.1.1 Determinação dos domínios na sequência de aminoácidos do gene *ORF2*

Em base a semelhanças com a cepa *TAstV-2* (*PDB entry 3TS3*), foram determinadas a localização dos domínios da sequência predita do gene *ORF2*, as quais são representadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Localização dos domínios proteicos dentro da sequência predita do capsídeo viral nas cepas ANV

Domínio		Localização em <i>TAstV-2</i>	Localização em <i>ANV</i>
Constante (<i>Basic</i> + S + P1)		1 – 423	1 – (398 - 402)
Variável	P2 (Espícula)	423 – 670	(399 - 403) – (585 - 591)
	<i>Acidic Domain</i>	671 - 724	(586 - 592) – (667 - 682)

Fonte: (LUNA, 2016).

5.3.2.1.2 Regiões conservadas das sequências de *ANV* e entre as distintas espécies e/ou genótipos de astrovírus aviários

Todos as regiões conservadas dentro das sequências de *ANV* e que também são achadas em sequências padrões de astrovírus aviários (*DAstV*, *TAstV*-2, *ANV*, *TAstV*-1 e *CAstV*, as quais foram descritas no início na Quadro 1), se localizam no domínio constante.

Figura 15 - Alinhamento das sequências de aminoácidos preditos do gene *ORF2* das sequências deste estudo e visualização da localização dos domínios com relação a cepa *TAstV-2* e regiões conservadas (Continua)

(Continuação)

Avian AstV Brazil 5-1	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Avian AstV Brazil 5-2	RK	ETV	WAA	GAIV	DTAT	PLLP	GWGL	LKGG	FVLR	KKISG
Avian AstV Brazil 5-3	K...	Q...	V...	AIE	EAVA	I...	F...	I...	F...	VSTL
Avian AstV Brazil 5-4	K...	Q...	V...	AIE	EAVA	I...	F...	I...	F...	VSTL
Avian AstV Brazil 19-1	K...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRA	AGGQ
Avian AstV Brazil 19-4	S.R	Q...	V...	A	EA	A...	F...	AGTR	TGSQ	I...
Avian AstV Brazil 19-2	...	...	V...	A	...	...	F...	G...	...	...
Avian AstV Brazil 19-5	...	...	V...	A	...	...	F...	G...	...	...
Avian AstV Brazil 45-2	K...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRT	AGGQ
Avian AstV Brazil 45-4	K...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRT	AGGQ
Avian AstV Brazil 45-6	K...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRT	AGGQ
Avian AstV Brazil 45-3	S...	Q...	V...	AI	A.A	I...	F...	A.VT	TGPQ	I...
Avian AstV Brazil 46-2	K...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRT	AGGQ
Avian AstV Brazil 46-4	K...	R...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRT
Avian AstV Brazil 46-5	K...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRT	AGGQ
Avian AstV Brazil 46-1	K...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRT	AGGQ
Avian AstV Brazil 48-1	K...	Q...	V...	AI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRA	AGGQ
Avian AstV Brazil 48-7	K...	Q...	V...	VI	A.A	I...	Q...	F...	GSSTRA	AGGQ
Avian AstV Brazil 48-5	...	...	V...	A	...	...	F...	G...	...	...
Avian AstV Brazil 48-9	...	...	V...	A	...	...	F...	G...	...	...
Avian AstV Brazil 57-1	...	...	V...	V	A.A	...	F...	AG	D...	...
Avian AstV Brazil 57-9	...	...	V...	V	A.A	...	F...	AG	D...	...
Avian AstV Brazil 57-3	S...	Q...	V...	AI	A.A	...	F...	A.TT	TGSQ	I...
Avian AstV Brazil 57-5	S...	Q...	V...	TAIE	A.A	...	F...	AGTR	TGSQ	I...
Avian AstV Brazil 55-4	S...	Q...	V...	TAIE	A.A	...	F...	AGTR	TGPQ	I...
Avian AstV Brazil 55-8	S...	Q...	V...	AI	A.A	...	F...	ATTT	TGSQ	I...
Avian AstV Brazil 59-3	S...	Q...	V...	AI	A.A	...	F...	ATTT	TGSQ	I...
Avian AstV Brazil 59-5	S...	Q...	V...	AI	A.A	...	F...	ATTT	TGSQ	I...
Avian AstV Brazil 5-1	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Avian AstV Brazil 5-2	PP	SASS	APQP	PPQP	SSILE	LSLLE	GGQR	GVPP	LYTFS	GG
Avian AstV Brazil 5-3	N...	TR	SLP	...	VQ	...	V...	Q...	T...	A.S.A
Avian AstV Brazil 5-4	N...	TR	SLP	...	VQ	...	V...	Q...	T...	A.S.A
Avian AstV Brazil 19-1	V...	RYG	T...	LEE	PE	...	A.I.	SD	AV	EYI
Avian AstV Brazil 19-4	...	TS	GAP	A	VQD	...	I...	AE	T...	S...
Avian AstV Brazil 19-2	...	S.A	L...	A...	PT	...	T.T	NG	I...	M.SY
Avian AstV Brazil 19-5	...	S.A	L...	A...	PT	...	T.T	NG	I...	M.SY
Avian AstV Brazil 45-2	A...	RYG	T...	TED	PE	...	A.T	P...	V.Q	G.S
Avian AstV Brazil 45-4	A...	RYG	T...	TED	PE	...	A.T	P...	V.Q	G.S
Avian AstV Brazil 45-6	S.T	R	SLP	TP	AQE	...	K...	T...	S...	A...
Avian AstV Brazil 45-3	N.T	R	SLP	TP	AQE	...	K...	T...	S...	A...
Avian AstV Brazil 46-2	A...	RYG	I...	TED	PE	...	A.T	P...	V.Q	G.S
Avian AstV Brazil 46-4	A...	RYG	I...	TED	PE	...	A.T	P...	V.Q	G.S
Avian AstV Brazil 46-5	A...	RYG	I...	TED	PE	...	A.T	P...	V.Q	G.S
Avian AstV Brazil 46-1	A...	RYG	I...	TED	PE	...	A.T	P...	V.Q	G.S
Avian AstV Brazil 48-1	V...	RYG	T...	LEE	PE	...	A.I.	SD	AV	EYI
Avian AstV Brazil 48-7	V...	RYG	T...	LEE	PE	...	A.I.	SD	AV	EYI
Avian AstV Brazil 48-5	...	S.A	L...	A...	PT	...	T.T	NG	I...	M.SY
Avian AstV Brazil 48-9	...	S.A	L...	A...	PT	...	T.T	NG	I...	M.SY
Avian AstV Brazil 57-1	L...	T...	...	...	...	...	Y...	...	...	...
Avian AstV Brazil 57-9	L...	T...	...	...	...	...	Y...	...	...	...
Avian AstV Brazil 57-3	N.T	R	SLP	TP	AQE	...	K...	T...	S...	A...
Avian AstV Brazil 57-5	...	TS	GVP	A	VQD	...	I...	AE	T...	S...
Avian AstV Brazil 55-4	...	TS	GVP	A	VQD	...	I...	AE	T...	S...
Avian AstV Brazil 55-8	N.TS	SVP	...	T	VQE	...	K...	T...	P...	A...
Avian AstV Brazil 59-3	N.TS	SVP	...	T	VQE	...	K...	T...	P...	A...
Avian AstV Brazil 59-5	N.TS	SVP	...	T	VQE	...	K...	T...	P...	A...
Avian AstV Brazil 5-1	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
Avian AstV Brazil 5-2	TG	IFFG	FGTY	QNG	GAFHT	KTKT	LLYS	LKNS	PD	RKPWL
Avian AstV Brazil 5-3	NRV...	A	DFLP	GI	AR	...	F	G	DAI	...
Avian AstV Brazil 5-4	V...	A	DFLP	GI	AR	...	FTG	DP	I...	...
Avian AstV Brazil 19-1	F.V	...	SNG	LS	...	I...	SR	MIH	...	TN
Avian AstV Brazil 19-4	F.V	...	SNG	LS	...	I...	SR	MIH	...	TN
Avian AstV Brazil 19-2	F.VL	...	R...	LG	GV	...	A.S	T	IF	...
Avian AstV Brazil 19-5	F.VL	...	R...	LG	GV	...	A.S	T	IF	...
Avian AstV Brazil 45-2	FAV...	D	LGE	PL	...	M...	FD	GEAS	DCGP	...
Avian AstV Brazil 45-4	FAV...	D	LGE	PL	...	M...	FD	GEAS	DCGP	...
Avian AstV Brazil 45-6	F...	D	LG	GV	...	A...	TAITS	SNP	DCSR	...
Avian AstV Brazil 45-3	F...	D	LG	GV	...	A...	TAITS	SNP	DCSR	...
Avian AstV Brazil 46-2	FAV...	D	LGE	PL	...	M...	FD	GEAS	DCGP	...
Avian AstV Brazil 46-4	FAV...	D	LGE	PL	...	M...	FD	GEAS	DCGP	...
Avian AstV Brazil 46-5	FAV...	D	LGE	PL	...	M...	FD	GEAS	DCGP	...
Avian AstV Brazil 46-1	FAV...	D	LGE	PL	...	M...	FD	GEAS	DCGP	...
Avian AstV Brazil 48-1	F.V	...	SNG	LS	...	I...	SR	MIH	...	TN
Avian AstV Brazil 48-7	F.V	...	SNG	LS	...	I...	SR	MIH	...	TN
Avian AstV Brazil 48-5	F.VL	...	R...	LG	GV	...	A.S	T	IF	...
Avian AstV Brazil 48-9	F.VL	...	R...	LG	GV	...	A.S	T	IF	...
Avian AstV Brazil 57-1	N...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Avian AstV Brazil 57-9	N...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Avian AstV Brazil 57-3	N...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Avian AstV Brazil 57-5	F.V	...	SNG	LS	...	I...	SR	MIH	...	TN
Avian AstV Brazil 55-4	F.V	...	SNG	LS	...	I...	SR	MIH	...	TN
Avian AstV Brazil 55-8	F...	D	LG	GV	...	A...	TAITS	SNP	DCSR	...
Avian AstV Brazil 59-3	F...	D	LG	GV	...	A...	TAITS	SNP	DCSR	...

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Avian AstV Brazil 5-1	NNN-TGSQAAPSTIMCLYNVDAGRAPV	-LTGGHLPFFILPS	NEVEVDGD	EDDDISLADSCREEFDCVPEYEQERERLIKRLRELD	FHRFQV					
Avian AstV Brazil 5-2	RAD-S.Q.SFST-LP	D.R-SQFVI	T.F	G.IQD.N.DEL.K.D.MR.D.LR	I					
Avian AstV Brazil 5-3	HAD-S.Q.SFST-LP	D.R-SQFVI	T.F	G.IQD.N.DEP.K.D.MR.D.LR	I					
Avian AstV Brazil 5-4	TGTGAARPNL.SML	D.RIQG-FL.S.S	QNEFV.DNQ.L-SD	G.IGD.EG.DQLDR.D.MR	LR	I				
Avian AstV Brazil 19-1	A-GAAR.N.TSML	TSPTPTFP.ALQTD	SDLAKTDE-D	IVNN.YER.DRL.N.H.MR	I	I.AQ	I			
Avian AstV Brazil 19-2	SV.SAFQI.SL	P.SFS.TSREG.M.A	FD.DL.A-D	D	DIL.D	L				
Avian AstV Brazil 19-5	SV.SAFQI.SL	P.SFS.TSREG.M.A	FD.DL.A-D	D	DIL.D	L				
Avian AstV Brazil 45-2	HAG-G.AAPT.ESLL	ITTNFNFQ.NWNTQALGLQHS.T	E-SD	FINN.LG.DQL	H.LR	DI.AK	TI			
Avian AstV Brazil 45-4	HAG-GSAAPT.DSLL	ITTNFNFQ.NWNTQALGLQHS.T	E-SD	FINN.LG.DQL	R.Q.LR	DI.AK	TI			
Avian AstV Brazil 45-6	HTG-S.A.E.TSL.Q	R-VPHFIIITTTAK	GSDS	G.VGD.EG.QLDR	AE.MS	LR	I			
Avian AstV Brazil 45-3	HTG-S.A.E.TSL	R-VPHFIIITTTAK	GSDS	G.VGD.EG.QLDR	AE.MC	LR	I			
Avian AstV Brazil 46-2	HAG-GTAAP.NSLL	S.TTNFNFQ.NWDTQSPGLQHS.T	E-SD	FINN.GG.DQL	Q.LR	DI.AK	LTI			
Avian AstV Brazil 46-4	HAG-GTAAP.NSLL	S.TTNFNFQ.NWDTQSPGLQHS.T	E-SD	FINN.GG.DQL	Q.LR	DI.AK	TI			
Avian AstV Brazil 46-5	HAG-GTAAP.NSLL	S.TTNFNFQ.NWDTQSPGLQHS.T	E-SD	FINN.GG.DQL	Q.LR	DI.AK	TI			
Avian AstV Brazil 46-1	HAG-GTAAP.NSLL	S.TTNFNFQ.NWDTQSPGLQHS.T	E-SD	FINN.GG.DQL	Q.LR	DI.AK	TI			
Avian AstV Brazil 48-1	TGTGAARPNL.SML	Y.D.RIQG-FL.S.S	QNEFV.DNQ.L-SD	G.IGD.EG.DQLDR	D.MR	LR	I			
Avian AstV Brazil 48-7	TGTGAARPNL.SML	D.RIQG-FL.S.S	QNEFV.DNQ.L-SD	G.IGD.EG.DQLDR	D.MR	LR	I			
Avian AstV Brazil 48-5	SV.SAFQI.SL	P.SFS.TSREG.LM.A	FD.DL.A-D	D	DTL.D	L				
Avian AstV Brazil 48-9	SV.SAFQI.SL	P.SFS.TSREG.M.A	FD.DL.A-D	D	DTL.D	L				
Avian AstV Brazil 57-1			V.SP							
Avian AstV Brazil 57-9			V.SP							
Avian AstV Brazil 57-3	HVG-S.A.E.T.L	A-VPHFIIITTTAK	F.ESDI	NQ.LGG.DQL	AE.MR	D	LR	I		
Avian AstV Brazil 57-5	A-GAAR.N.TSML	TTPTPTFL.TLQTD	SDLAKTDE-D	IVNN.YER.DRL.N.H.MR	I	I.AQ	I			
Avian AstV Brazil 55-4	A-GAAR.N.TSML	TTPTPTFL.TLQTD	SDLAKTDE-D	IVNNGYER.DRL.N.H.MR	I	I.AQ	I			
Avian AstV Brazil 55-8	HTG-S.A.E.TSL	S-VPHFIIITTTAK	GSDS	G.VGD.EG.DQLDR	AE.MS	LR	I			
Avian AstV Brazil 59-3	HTG-S.A.E.TSL	S-VPHFIIITTTAK	GSDS	G.VGD.EG.DQLDR	AE.MS	LR	I			
Avian AstV Brazil 59-5	HTG-S.A.E.TSL	S-VPHFIIITTTAK	GSDS	G.VGD.EG.DQLDR	AE.MS	LR	I			

Fonte: (LUNA, 2016).

Legenda:

Domínio constante: —

Domínio variável: —

Domínio P2 (espícula):

Domínio ácido:

Regiões conservadas entre espécies e/ou genótipos distintos:

5.3.2.2 Determinação do genótipo das sequências de ANV deste estudo

A análise filogenética de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *ORF2* demonstrou que apenas cinco cepas deste estudo foram classificadas dentro do critério proposto pelo *Astroviridae Study Group*. Os restantes das sequências não se agruparam com outras sequências de referência para cada genótipo, porém formaram dois clados diferentes, o que poderiam sugerir dois novos genótipos de ANV (Figuras 16 e 17). Estes novos genótipos foram denominados provisoriamente genótipo 8 e genótipo 9. Chegou-se a esta conclusão devido a que a distância p entre o genótipo *AAstV-5* e o genótipo 8 foi de 0,32 (valor mínimo), entre o *AAstV-5* e o genótipo 9 de 0,36 (valor mínimo) e o genótipo 8 e genótipo 9 de 0,36, sendo que o valor máximo de distância-p é de 0,299 entre sequências de um mesmo grupo (Tabela 4). A designação das sequências 5-3 e 5-4 dentro do genótipo 8, oferece ainda certas

dúvidas devido à que apresenta valores maiores de 0,299 de distância-p com as sequências 19-4, 55-5 e 57-5, e valores dentro de limite (0,28) com a outras sequências que conformam o grupo.

Nove sequências obtidas neste estudo (19-1, 48-1, 48-7, 45-2, 45-4, 46-1, 46-2, 46-4 e 46-5), se agruparam com sequências pertencentes ao genótipo *AAsV* 5, que compreende sequências isoladas na China, uma cepa procedente de pombos (HQ889774) detectado em casos de diarreia (ZHAO et al., 2011a) e outra cepa isolada em frangos aparentemente saudáveis (ZHAO et al., 2011b). Este agrupamento deixou algumas duvidas com as sequências 19-1, 48-1 e 48-7 devido a que estas têm um valor de distância-p maior a 0,299 em relação a outras sequências de referência do genótipo 5 (Cepa SH10 do ANV e ANV-1 isolado no China), porem, tendo um valor menor (0,17) em relação às outras sequências que conformam este grupo.

Tabela 4 Matriz de distância-*p* entre as sequências dos distintos genótipos de ANV detectados neste estudo. *Cutoff*: 0,414-0,728 (entre genótipos) e 0,047-0,299 (intra-genótipo)

Strain ANV		Clado 8										Clado 9										AAstV 5									
		55-4	59-5	59-3	45-3	45-6	57-3	19-4	57-5	55-5	5-3	5-4	5-1	5-2	57-1	57-9	48-9	19-2	19-5	48-5	SH10	ANV-1	19-1	48-1	48-7	45-2	45-4	46-1	46-5	46-4	46-2
Clado 8	Avian AstV Brazil 55-4																														
	Avian AstV Brazil 59-5	0.01																													
	Avian AstV Brazil 59-3	0.02	0.02																												
	Avian AstV Brazil 45-3	0.05	0.05	0.04																											
	Avian AstV Brazil 45-6	0.05	0.05	0.05																											
	Avian AstV Brazil 57-3	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09																									
	Avian AstV Brazil 19-4	0.2	0.2	0.21	0.21	0.22	0.21	0.03																							
	Avian AstV Brazil 57-5	0.21	0.21	0.21	0.21	0.22	0.21	0.04	0.01																						
	Avian AstV Brazil 55-5	0.21	0.21	0.21	0.21	0.22	0.21	0.04	0.01																						
	Avian AstV Brazil 5-3	0.28	0.28	0.28	0.28	0.29	0.27	0.32	0.32	0.32																					
Clado 9	Avian AstV Brazil 5-4	0.28	0.28	0.28	0.28	0.29	0.27	0.32	0.32	0.32	0.01																				
	Avian AstV Brazil 5-1	0.37	0.37	0.36	0.37	0.37	0.35	0.39	0.4	0.4	0.36	0.36																			
	Avian AstV Brazil 5-2	0.37	0.37	0.36	0.37	0.37	0.35	0.39	0.4	0.4	0.36	0.36	0																		
	Avian AstV Brazil 57-1	0.36	0.36	0.36	0.36	0.37	0.34	0.39	0.4	0.4	0.36	0.36	0.1	0.1																	
	Avian AstV Brazil 57-9	0.36	0.36	0.36	0.36	0.37	0.34	0.39	0.4	0.4	0.36	0.36	0.1	0.1	0																
	Avian AstV Brazil 48-9	0.37	0.37	0.37	0.37	0.38	0.38	0.39	0.39	0.39	0.4	0.4	0.16	0.16	0.21	0.2															
	Avian AstV Brazil 19-2	0.37	0.37	0.37	0.37	0.38	0.38	0.39	0.4	0.4	0.4	0.4	0.16	0.16	0.21	0.21	0.01														
	Avian AstV Brazil 19-5	0.37	0.37	0.37	0.37	0.38	0.38	0.39	0.4	0.4	0.4	0.4	0.16	0.16	0.21	0.21	0.01	0													
	Avian AstV Brazil 48-5	0.37	0.37	0.37	0.37	0.38	0.38	0.39	0.39	0.39	0.39	0.4	0.16	0.16	0.21	0.21	0.01	0.01	0.01												
	Pigeon ANV SH10	0.35	0.35	0.35	0.34	0.35	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.39	0.4	0.36	0.36	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.04										
AAstV 5	ANV-1 from China	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.39	0.39	0.36	0.36	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.32	0.01								
	Avian AstV Brazil 19-1	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34	0.37	0.36	0.38	0.38	0.37	0.37	0.4	0.4	0.4	0.33	0.32									
	Avian AstV Brazil 48-1	0.33	0.33	0.33	0.32	0.33	0.33	0.34	0.34	0.34	0.36	0.37	0.38	0.38	0.37	0.37	0.4	0.4	0.4	0.4	0.33	0.32	0.01								
	Avian AstV Brazil 48-7	0.33	0.33	0.33	0.32	0.33	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34	0.37	0.37	0.38	0.38	0.37	0.37	0.4	0.4	0.4	0.33	0.32	0.02	0.01							
	Avian AstV Brazil 45-2	0.34	0.34	0.34	0.35	0.35	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34	0.37	0.32	0.37	0.37	0.37	0.39	0.39	0.39	0.39	0.25	0.26	0.17	0.17	0.17						
	Avian AstV Brazil 45-4	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.34	0.34	0.35	0.35	0.39	0.39	0.39	0.39	0.38	0.38	0.4	0.4	0.4	0.27	0.26	0.17	0.16	0.17	0.04					
	Avian AstV Brazil 46-1	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.36	0.36	0.35	0.35	0.35	0.39	0.39	0.38	0.38	0.38	0.38	0.4	0.4	0.4	0.26	0.26	0.18	0.17	0.17	0.07					
	Avian AstV Brazil 46-5	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.38	0.38	0.4	0.4	0.4	0.26	0.26	0.18	0.17	0.17	0.07	0.07				
	Avian AstV Brazil 46-4	0.36	0.36	0.36	0.37	0.37	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.4	0.4	0.4	0.26	0.26	0.18	0.17	0.17	0.07	0.08	0.02			
	Avian AstV Brazil 46-2	0.37	0.37	0.37	0.37	0.37	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.4	0.4	0.4	0.26	0.26	0.18	0.17	0.17	0.08	0.08	0.02	0.02		0.01

Figura 16 - Árvore filogenética baseada na sequência nucleotídica do gene *ORF2*. A árvore foi construída sob o método de Máxima Verossimilhança, usando o modelo de substituição GTR+G. As sequências deste estudo são mostradas com um triângulo preto ao lado. Os dois clados que não se agruparam com as sequências de referência foram denominadas para efeitos do estudo como “Genótipo 8” e “Genótipo 9”

Fonte: (LUNA, 2016).

Figura 17 - Árvore filogenética baseada na sequência de aminoácidos do capsídeo. A árvore foi construída sob o método de Máxima Verossimilhança, usando o modelo de substituição LG+G+I+F. São mostradas com um triângulo preto ao lado as sequências deste estudo. Os dois clados que não se agruparam com as sequências de referência foram denominadas para efeitos do estudo como “AAstV 8” e “AAstV 9”

Fonte: (LUNA, 2016).

5.3.2.3 Análise de diversidade das sequências de ANV

A análise filogenética das sequências de ANV visando à diversidade foi realizada usando representantes listados na Quadro 8 (só sequências do gene *ORF2* completo). Com base na divergência do gene *ORF2*, foi possível dividir as sequências disponíveis no *GenBank* em dois grupos. Um grupo deles, procedente de Ásia e Europa, e outro grupo, procedente de Estados Unidos, sendo do primeiro grupo aquelas que mais se assemelharam com as sequências deste estudo, em comparação com aquelas procedentes de Estados Unidos, que não guardaram nenhuma relação.

A Figura 18, a análise filogenética das sequências de amino ácidos deduzido do gene *ORF2*, permitiu observar a divisão das sequências deste estudo em 9 grupos, feito baseado nos estudos realizados por Todd et al. (2011). Os agrupamentos das amostras deste estudo mostram alguns grupos só com sequências brasileiras (Grupo A e B) e outros grupos “híbridos”, mostrando agrupamentos das sequências deste estudo com sequências procedentes de Austrália e do Reino Unido (Grupo 3 VF04-1/2-like, grupo 4 VF07-13/7 like e o grupo 6 VF08-65 like, reportado anteriormente por Todd et al., 2011).

Com o objetivo de observar se o agrupamento observado previamente acontece da mesma maneira com sequências nucleotídicas, a análise filogenética mostrou resultados semelhantes, exceto, na distribuição das sequências nos grupos 4 VF07-13/7 like e 5 VF08-3a-like, como é observado na figura 19.

Figura 18 - Análise filogenética baseada nas sequências aminoacídicas do capsídeo viral. A árvore filogenética foi construída usando o método de máxima verossimilhança, usando o modelo de substituição LG+G+F

Fonte: (LUNA, 2016).

Figura 19 - Análise filogenética baseada nas sequências nucleotídicas do capsídeo viral. A árvore filogenética foi construída usando o método de máxima verossimilhança, usando o modelo de substituição nucleotídica GTR G+I. As amostras deste estudo foram marcadas com um triângulo preto

Fonte: (LUNA, 2016).

5.3.3 Análise da *ORF2* para a espécie *Chicken Astrovirus* (*CAstV*).

Das duas amostras positivas para *CAstV*, foi possível a amplificação de uma delas, usando os *primers* descritos por Smyth et al., 2011. A amostra positiva, identificada com o código Avian AstV Brasil 54, foi procedente de Rio Grande do Sul, de uma criação de postura comercial de aves de 32 semanas de idade, sendo identificada só uma cepa desta espécie viral.

5.3.3.1 Análise de diversidade da cepa de *CAstV*

A sequência detectada neste estudo agrupou-se junto com um grupo de cepas denominado Subgrupo BII do Grupo UK, detectado e descrito por Smyth et al. (2012), que agrupa cepas de *CAstV* isoladas em Alemanha (VF08-29) e Reino Unido (VF08-3, VF06 7/3 e VF07-4/2) e outras cepas que foram usadas em estudos de testes de vacinas e inoculação experimental em Estados Unidos (GA2011 e 4175) (KANG et al., 2012). A topologia entre a amostra deste estudo com outras sequências homólogas está representada na Figura 20.

Figura 18 - Análise filogenética baseada na sequência deduzida de aminoácidos do gene *ORF2* da sequência de *CAstV* detectado neste estudo. A árvore foi construída empregando o método de Máxima Verossimilhança, usando o modelo de substituição GTR+G. A sequência deste estudo está marcada com um triângulo preto.

Fonte: (LUNA, 2016).

5.3.4 Análise do *ORF2* para *TAstV-1*

Das 6 amostras positivas a *TAstV-1*, foi possível a análise do gene *ORF2* em apenas uma amostra positiva usando os *primers* desenhados neste estudo. A amostra positiva, identificada com o código Avian AstV Brasil 58, procedeu de Rio Grande do Sul, de uma criação comercial de frangos de corte, sendo identificada só uma cepa desta espécie viral

5.3.4.1 Análise de diversidade da cepa de *TAstV-1*

Devido a pouca informação disponível no relacionado a sequências de *TAstV-1*, não foi possível fazer um análise detalhada sobre a epidemiologia da cepa. Apenas algumas sequências detectadas em Estados Unidos foram usadas para fazer a análise, mostrando uma divergência entre estas cepas (Figura 21).

Figura 19 - Análise de diversidade do *TAstV-1*, a árvore foi construída usando o método de Máxima Verossimilhança, com o método de substituição K2P. A sequência deste estudo esta marcada com um triângulo preto

Fonte: (LUNA, 2016).

6 DISCUSSÃO

Este trabalho investigou a situação dos astrovírus aviários no Brasil mediante análise molecular de um gene conservado, como o *RdRp* (*ORF1b*) e um gene altamente variável como o gene que codifica o capsídeo viral (*ORF2*). Foram achados genótipos e grupos não relatados na literatura assim como grupos comuns entre cepas de outros continentes. A análise do gene conservado gerou conhecimentos preliminares sobre a ocorrência e espécie de astrovírus presente nas amostras, enquanto que a análise do gene variável permitiu confirmar o achado de espécie, genotipagem e análises de diversidade com o intuito de estabelecer relações epidemiológicas com outras cepas.

A metodologia usada para a análise de detecção inicial, mediante a amplificação e sequenciamento de um fragmento parcial do gene *RdRp*, localizado no *ORF1*, uma região conservada em todas as espécies de astrovírus de mamíferos e aves, foi aplicável nas amostras deste estudo, que por sua vez consistiram em amostras fecais de frangos de produção de distintos fins e tipos de localização. A amostragem deste estudo, ainda que de conveniência, foi proveniente de granjas de alta produção, o que permitiu obter uma frequência de 48,3% (29/60 amostras testadas), o que sugere uma elevada circulação deste vírus nestes plantéis avícolas.

Os primeiros relatos de detecção de espécies de Astrovírus em aves no Brasil datam do ano 2006, Villarreal et al. (2006), descreveu uma infecção por *TAstV-2* em perus procedentes da região sudeste do Brasil, zona altamente produtora de aves, afetando 7 de 17 (41%) de granjas que apresentavam problemas de morbidade e mortalidade de uma doença entérica, mediante uso de *primers* específicos para esta espécie de Astrovírus. É interessante ressaltar a alta taxa de infecção por este vírus, considerando que foi pesquisada apenas uma espécie, podendo ser maior, devido a eventual infecção por outras espécies de astrovírus, como foi demonstramos no presente estudo (item 5.1). Outros relatos, considerando apenas esta espécie viral (*TAstV-2*), apresentam altas taxas de infecção (quase 100%), em perus com problemas de PEC (*Poult Enteritis Complex*) (DA SILVA et al., 2008; DA SILVA et al., 2009).

A descrição de outras espécies de Astrovírus, feito em aves no Brasil foi realizado em perus por Moura Alvarez et al. (2013), coletando aleatoriamente 76 amostras de perus de diversas idades de diferentes estados, descrevendo uma frequência de 64,5% para *TAstV*-1, 44,7% para *TAstV*-2 e 35,5% para *ANV*, usando *primers* específicos para cada espécie de vírus, uma taxa bastante alta de infecção em aves de produção.

Um dos primeiros trabalhos sobre detecção de astrovírus em frangos no Brasil foi realizado por Bello (2011), num estudo que descreveu a presença de apenas uma espécie de astrovírus, o *CAstV*, em 11,7% das amostras testadas. Já Mettifogo et al. (2014), faz um estudo mais amplo, empregando amostras procedentes de criações comerciais de aves maioritariamente da região sul, reportando duas espécies de astrovírus (*ANV* e *CAstV*), em 29,6 e 21,1% das amostras testadas, respectivamente, detectando maiormente em aves com sintomatologia clínica.

É importante ressaltar que, para o nosso conhecimento, os relatos sobre astrovírus em aves brasileiras baseiam sua detecção em protocolos de PCR usando *primers* específicos, enquanto que no presente trabalho utilizamos *primers* genéricos, aumentando a abrangência de astrovírus detectáveis, além dos específicos.

É interessante também ressaltar que a grande maioria de casos de detecção de astrovírus se concentra maioritariamente na região sul do Brasil, nos estados de Rio Grande do Sul e Paraná, o que é refletido na grande produção de frangos nestas regiões Sudeste e Sul (UBABEF, 2014).

O posterior sequenciamento de um fragmento do gene conservado *ORF1b* nas 29 amostras positivas, que permitiria preliminarmente o diagnóstico da espécie viral, apresentou três grupos distintos de astrovírus, os quais, quando alinhados com sequências de referência importadas do *GenBank*, geraram como resultado a detecção de *Avian Nephritis Virus* (*ANV*), *Chicken Astrovirus* (*CAstV*) e *Turkey Astrovirus* tipo 1 (*TAstV*-1) em 21, 2 e 6 das amostras positivas, respectivamente (item 5.2). O achado de *ANV* e *CAstV* no presente trabalho está, portanto, de acordo com a literatura, porém ressalta-se a detecção *TAstV*-1 (*Avastrovirus* 1) em frangos, até então nunca descrito nesta espécie.

Assim, ambos os vírus, *ANV* e *CAstV*, estão relacionadas com doenças entéricas e sistêmicas, como diarreias, falha na absorção de nutrientes e nefropatias, que é uma causa frequente de mortalidade em aves na indústria aviária, e além disso, danos histológicos visíveis em outros tecidos, como fígado, baço, timo e bursa, vistos em caso de infecção experimental (SHIRAI et al., 1991; PANTIN-JACKWOOD; TODD; KOCI, 2013, GHODASARA et al., 2015).

Já o *TAstV-1*, astrovírus originário de perus pode ser considerada uma provável transmissão interespecie. Neste estudo, o vírus foi detectado em seis amostras, procedentes na sua maioria do Rio Grande do Sul, não sendo possível determinar se teve criações concomitantes com outras aves de produção, como perus.

Relatos sobre transmissão interespecie de astrovírus aviários já foram descritos, por exemplo, o *ANV* que tem sido descrito frequentemente em frangos, perus, pombos, patos (BIDIN et al., 2011) e galinha pintada (CANELLI et al., 2012). Também, o vírus *TAstV-2*, detectado em galinhas pintadas (CATOLLI et al., 2007) e frangos (BIDIN et al., 2013). Filogeneticamente, *TAstV-1* demonstrou estar mais relacionado com *ANV* e *CAstV*, formando um genogrupo denominado *Avastrovírus* II (baseado em genomas completos) (PANTIN-JACKWOOD; TODD; KOCI, 2013), em relação ao *TAstV-2* e *DAstV* (que formam outro genogrupo denominado *Avastrovírus* I). Esta relação filogenética de *TAstV-1* com outras espécies que infectam frangos poderia indicar uma possível relação entre cepas potencialmente infectantes deste espécie animal, embora, se tratando de vírus RNA, a mutação e/a recombinação genética, a transmissão a outra espécie, a readaptação a novo habitat e amplificação em seu novo hospedeiro é possível (DOMINGO; HOLLAND. 1997). Devido a uma maior distribuição e ubiquidade do vírus *TAstV-2*, a informação sobre mecanismos patogênicos, informação genômica e outros sobre *TAstV-1* é escassa na literatura.

Com o objetivo de caracterizar as cepas de *ANV*, *CAstV* e *TAstV-1* detectadas neste estudo, posteriormente a análise do gene conservado *ORF1b*, tentou-se sequenciar o gene variável *ORF2*, codificante do capsídeo viral. Para isso, usaram-se protocolos descritos na literatura e desenvolvidos neste estudo. O capsídeo viral, responsável pela união e ingresso à célula hospedeira, é uma proteína multi-domínio com uma região C altamente variável, que é importante na união a receptor, tropismo celular, patogênese viral e estimular o sistema imune (KRISHNA, 2006).

A variabilidade observada no capsídeo pode ser devida pela alta pressão imunológica exercida, pelo fato de que esta proteína é capaz de gerar no hospedeiro anticorpos neutralizantes (BASS; UPADHYAYULA, 1997; MENDEZ-TOSS et al., 2000). Esta característica é útil no momento de estabelecer grupos e vínculos epidemiológicos entre cepas.

A análise do gene *ORF2* nas cepas de ANV, revelou aspectos interessantes, entre eles a presença de cepas co-circulantes (mais de uma cepa viral) numa mesma amostra (item 5.3.1) e novos genótipos (item 5.3.2.2) e agrupamentos (item 5.3.2.3) não descritos na literatura. Das 21 amostras positivas para ANV, foi possível o sequenciamento do gene *ORF2* em oito delas com o protocolo usado, apesar do uso de *primers* desenhados para abranger todas as variantes reportadas na literatura (item 4.9.1 - 4.9.4).

A presença destas cepas co-circulantes numa mesma amostra, foi demonstrado mediante uso de clonagem molecular da sequência *ORF2*, sendo esta técnica muito eficiente para descrever este evento. A grande variabilidade deste gene permitiu detectar mais de uma cepa de ANV dentro de uma mesma amostra, achado não revelado na análise do gene *ORF1b*. A porcentagem de distância-p entre sequências de uma mesma amostra no nível do gene *ORF2* foi de 0,01 (1%) até 0,4 (40%).

Adicionalmente, como ferramenta para a detecção de cepas co-circulantes, além de uso da clonagem, têm se relatado em outro estudo outras técnicas como o Análise de Curvas de Dissociação de Alta Resolução (*HRMA, High Resolution Melting Analysis*), sendo descrito para Astrovírus por Chamings et al. (2015). A detecção de mais de uma cepa circulante num mesmo lote de aves ou amostra é importante porque representa uma fonte de possíveis eventos recombinatórios e co-infecções, que podem gerar novos tipos de vírus e se disseminar a outras espécies. Esta população heterogênea de vírus ANV, pode ser referida como quasiespecies, este termo descreve uma distribuição complexa de moléculas replicadoras submetidas à mutação e seleção competitiva (DOMINGO et al., 1992). Portanto, é a presença de uma mistura de variantes virais num indivíduo ou grupo de indivíduos relacionados. Estas variantes virais são produzidas como consequência de uma alta taxa de mutações durante a replicação viral, e em alguns casos por recombinação viral e/ou rearranjos de fragmentos genômicos (DOMINGO; SHELDON; PERALES, 2012). Este tipo de eventos, já foi observado em astrovírus humanos (MARTELLA et al., 2014), sendo considerado por alguns

científicos como uma importante assinatura de infecção por astrovírus em geral (CHAMINGS et al., 2015). Este tipo de eventos acontece majoritariamente em vírus RNA devido à alta propensão a erros da polimerase viral RNA dependente RNA polimerase (*RdRp*), que por sua vez são devidos a uma baixa fidelidade intrínseca e falta de mecanismos de correção da enzima (RAMIREZ et al., 2005). Altas taxas de replicação e de erros levam o acúmulo de mutações, e como consequência, a emergência de novas variantes virais num indivíduo ou população (LEE et al., 1992). Estas variantes virais surgem em casos de infecções de longa duração, usos de vacinas e/ou agentes virais, que ocasionam uma pressão de seleção (NOVELLA et al., 1995). As consequências deste processo, além da persistência de infecção no hospedeiro, são mudanças no tropismo viral e especificidade (HOLMES et al., 2006).

As sequências de *ORF2* dos ANV detectados neste estudo, como se enfatizou anteriormente, corresponderam a uma população heterogênea, as sequências, todas elas, procederam dos estados de Paraná e Rio Grande do Sul, não sendo possível o sequenciamento de gene *ORF2* nas amostras procedentes de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Pernambuco e Minas Gerais (item 5.3.1). A heterogeneidade das amostras pode explicar este fato, sendo que aquelas procedentes da região sul, como Paraná e Rio Grande do Sul, seja uma população viral onde os *primers* usados neste estudo, conseguiram se-hibridar, em relação às amostras de outros estados. Filogeneticamente, as sequências de *ORF2* de ANV se agruparam em três clados baseados na sequência de nucleotídeos e de aminoácidos, não tendo um padrão de distribuição definida de acordo com a procedência (Figura 14). A genotipagem, de acordo com os critérios descritos pelo *Astroviridae Study Group* (BOSCH et al., 2010b), determinou que as sequências deste estudo foram agrupadas em 3 genótipos, um deles foi agrupado dentro do genótipo 5, que incluem astrovírus aviários procedentes de pombos e galinhas na Ásia (item 5.3.2.2, Figuras 16 e 17). Os outros dois genótipos não foram reportados na literatura, sendo considerados como genótipos inéditos. Para a designação de um genótipo, a distância-p da sequência de aminoácidos do capsídeo viral está entre e dentro dos genótipos são 0,414-0,728 e 0,047-0,299, respectivamente. Assim, é confirmada a presença de dois novos genótipos de ANV não reportados na literatura. De acordo ao descrito na literatura científica, se tem reportado sete genótipos de astrovírus aviários, as quais os genótipos AAstV-2 e AAstV-5 correspondem a ANV (GUIX; BOSCH; PINTO, 2013). O genótipo 2 agrupa os ANVs típicos que infectam galinhas ao redor do mundo, enquanto que o genótipo 5, agrupa os ANVs originários de pombos e que também foram detectados em frangos na China (ZHAO et al., 2011). Como é descrito neste estudo, um grupo de sequências que foi detectado em frangos no

Brasil se agruparam dentro do genótipo 5 (Figura 16). Este grupo de vírus, apesar de ser originário de pombos, também foi identificado em frangos, sugerindo uma infecção cruzada que pode tomar lugar entre pombos e aves comerciais (ZHAO et al., 2011), porém não é possível determinar se a origem deste vírus é de aves silvestres ou de frangos infectados. Genótipos de astrovírus infectando mais de um hospedeiro tem sido reportado na literatura, o genótipo 3 (AAstV-3), que tem sido detectado em perus, patos e galinhas pintadas (CATTOLI et al., 2005; KOCI et al., 2007), o genótipo 2 (AAstV-2), detectado em perus e frangos (SHIRAI et al., 1991; IMADA et al., 2007). Estes eventos de transmissão interespecie não são incomuns, e revelam a capacidade de alguns astrovírus para infectar várias espécies sendo a significância de este fato elucidar a ecologia da transmissão de astrovírus entre espécies aviárias. As transmissões de vírus de aves silvestres a aves domésticas ou outro tipo de hospedeiros constitui um evento que já tem sido reportado anteriormente, sendo o vírus Influenza aviária, o caso mais reconhecido (PANIGRAHY et al., 1996). Outros vírus, como o vírus da doença de Newcastle (GELB JR; FRIES; PETERSON, 1987), também são disseminados por aves silvestres a aves domésticas.

As demais sequências de ANV detectados neste estudo, que foram agrupados em outros dois clusters, sem relação com as sequências de referência, foram provisoriamente denominados como genótipos 8 e 9, porque encaixam nos critérios de denominação de genótipo do *Astroviridae Study Group*, porém não tem semelhanças com nenhum outro genótipo reportados de ANV descrito na literatura (Figuras 16 e 17). A divergência destas sequências com algumas outras de referência já descrita nas bases de dados, poderia ser devido a eventos recombinatórios, ou formar parte de sequências que ainda não foram reportadas, sendo estas sequências de ANV, as únicas em América Latina.

A análise de diversidade genética usando a sequência de um gene hipervariável como o *ORF2*, permite obter mais informação sobre sua relação com outras sequências, estabelecendo nexos epidemiológicos. Na base de dados do *GenBank*, se tem disponíveis dois grupos de sequências de *ORF2* de ANV diferentes entre si, um grupo de sequências procedentes de Europa e Ásia, e outro grupo de sequências procedentes de Estados Unidos de América. As sequências deste estudo estiveram mais relacionadas com sequências procedentes de Europa e Ásia.

A comparação das sequências deste estudo com as sequências procedentes de Europa e Ásia formaram 14 clusters, os quais foram nomeados baseados ao estudo publicado anteriormente por Todd et al. (2011), na qual foram detectadas cepas de ANV em Reino Unido e Alemanha (item 5.3.2.3, Figuras 18 e 19). Foram somadas a este agrupamento, sequências procedentes de Austrália, reportado por Chamings et al. (2015) e China, reportadas por Zhao et al. (2011). Dentro destes agrupamentos, destaca-se a presença de clusters “híbridos”, com grupos com sequências de mais de uma procedência. Evidenciam-se *clusters* de sequências deste estudo outras procedentes de Austrália e Reino Unido, além de clusters com sequências exclusivamente brasileiras. Isto pode ser traduzir nos seguintes fatos: Uma relação de cepas de ANV detectados no Brasil com sequências australianas e do Reino Unido, comprovável existência e alta diversidade de cepas “autóctones” brasileiras de ANV.

A análise de diversidade, no estudo publicado por Todd et al. (2011), mostrou a presença de 6 clusters filogenéticos, apesar de que não se ter conseguido sequenciar o gene *ORF2* em todas as amostras de ANV, também foram observadas 6 clusters, destes, 4 clusters com só sequências brasileiras, um cluster misturado com sequências procedentes de Austrália, e outro cluster com sequências procedente do Reino Unido. A análise filogenética das sequências de *ORF2* dos ANV em trabalho de Chamings et al. (2015), permitiu observar 5 clusters, destes, dois deles, misturado dentro dos grupos observados no estudo de Todd et al. (2011). Em todas estas análises, é possível observar clusters com sequências de várias procedências e clusters com sequências de uma procedência só. Esta grande diversidade nas cepas de ANV pode representar um problema no momento de fazer o diagnóstico, detecção e a realização de análise de diversidade para um melhor entendimento da epidemiologia deste vírus.

No que diz respeito a diversidade das cepas de *CAsV*, a análise do gene *ORF2* mostrou uma relação da cepa deste estudo com cepas detectadas no Reino Unido, similar ao caso anterior. Destaca-se o fato de que são poucos os trabalhos feitos sobre sequenciamento do gene *ORF2* de *CAsV*, portanto, fica limitado o estabelecimento de nexos epidemiológicos entre cepas, porém, chama a atenção o fato de relação entre cepas brasileiras e europeias (item 5.3.3 e Figura 20).

Já a análise do gene *ORF2* da cepa de *TAsV*-1 foi igualmente limitada em função da pouca informação existente nas bases de dados, cuja conclusão, tal como aconteceu em caso

das cepas de ANV, uma divergência destas com suas homólogas de América do Norte (item 5.3.4 e Figura 21).

Finalmente, considerando que as diferentes espécies de astrovírus encontram-se disseminados nas diferentes criações de aves de diversos estados brasileiros, além de diversos genótipos e clusters, muitos deles não descritos ainda na literatura, mas relatado no presente estudo, torna-se necessário um maior estudo e maior entendimento deste agente, estendendo o estudo ao sequenciamento de genes variáveis em cepas que não puderam ser sequenciadas neste estudo, e associando os achados com sintomatologia e patologia, de modo de aprimorar a prevenção e controle desta doença.

7 CONCLUSOES

Podemos concluir que:

- Há a circulação de pelo menos três espécies de astrovírus infectando as aves de produção no Brasil: *ANV*, *CAstV* e *TAstV-1*.
- Foi detectada pela primeira vez a ocorrência de *TAstV-1* em frangos no Brasil, e a segunda detecção no mundo.
- Com relação ao *ANV*, há uma elevada diversidade genética expressada na existência de novos genótipos candidatos e clusters não relatados anteriormente na literatura.
- A amostra de *CAstV* brasileira guarda maior relação filogenética com cepas procedentes de Europa e Ásia, a comparação com cepas procedentes da América do Norte.
- A amostra de *TAstV-1* observada aqui em frangos foi divergente em relação às da América do Norte, isoladas a partir de perus.

REFERÊNCIAS

- AL-MUTAIRY, B.; WALTER, J. E.; POTHEN, A.; MITCHELL, D. K. Genome prediction of putative genome linked viral protein (VPg) of astrovírus. **Virus Genes**, v. 31, n. 1, p. 21-30, 2005
- BASS, D. M.; QIU, S. Proteolytic processing of the Astrovirus capsid. **Journal of Virology**, v. 74, n. 4, p. 1810-1814, 2000.
- BASS, D.; UPADHYAYULA, U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. **Journal of Virology**, v. 71, p. 8666–8671, 1997.
- BAXENDALE, W.; MEBATSION, T. The isolation and characterisation of astroviruses from chickens. **Avian Pathology**, v.33, p. 364–370, 2004.
- BELLO, C. P. **Detecção molecular e diagnostico diferencial de vírus entéricos em aves comerciais**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BIDIN, M.; LOJKIC, I.; BIDIN, Z.; TISLJAR, M.; MAJNARIC, D.; MIKEC, M. Detection and characterization of avian nephritis virus in ducklings. **Avian Pathology**, v. 40, p. 173-177, 2011.
- BIDIN, M.; BIDIN, Z.; MAJNARIC, D.; TISLJAR, M.; LOJKIC, I. Circulation and phylogenetic relationship of chicken and turkey-origin astroviruses detected in domestic ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*). **Avian Pathology**, v. 41, p. 555–562, 2012.
- BIDIN, M.; MAJNARIC, D.; BIDIN, Z.; LOJKIC, I. Genetic Characterization of turkey astroviruses identified in Croatian poultry flocks. **Veterinarski Arhiv**, v. 83, n. 1, p. 57-67, 2013.
- BOSCH, A.; GUIX, S.; KRISHNA, N. K.; MÉNDEZ, E.; MONROE, S. S.; PANTIN-JACKWOOD, M.; SCHULTZ-CHERRY, S. Nineteen new species in the genus *Mamastrovirus* in the *Astroviridae* family. Disponível em <<http://ictvonline.org/proposals/2010.018a-cV.A.v4.Mamastrovirus.pdf>>. Acesso em: 10 nov 2015.
- BOSCH, A.; GUIX, S.; KRISHNA, N. K.; MÉNDEZ, E.; MONROE, S. S.; PANTIN-JACKWOOD, M.; SCHULTZ-CHERRY, S. Three new species in the genus *Avastrovirus* in the *Astroviridae* family. Disponível em: <<http://ictvonline.org/proposals/2010.017a-cV.A.v3.Avastrovirus.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2015.
- BOSCH, A.; GUIX, S.; KRISHNA, N. K.; MÉNDEZ, E.; MONROE, S. S.; PANTIN-JACKWOOD, M.; SCHULTZ-CHERRY, S. Family *Astroviridae*. In: KING, A.M.Q.; LEFKOWITZ, E.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B. (Ed.). **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses** (Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses). New York: Elsevier Academic Press. 2011. p. 953–959.
- BOSCH, A.; PINTO, R. M.; GUIX, S. Human Astroviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 1048-1074, 2014.
- BRINKER, J. P.; BLACKLOW, N. R.; HERRMANN, J. E. Human astrovirus isolation and

propagation in multiple cell lines. **Archives of Virology**, v. 145, n. 9, p. 1847-1856, 2000.

BULBULE, N. R.; KAPGATE, S. S.; CHAWAK, M. M. Infectious Causes of Gout in Chickens. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 4, p. 255-260, 2014.

CANELLI, E.; CORDIOLI, P.; BARBIERI, I.; CATELLA, A.; PENNELLI, D.; CERUTI, R.; MORENO, A.; LAVAZZA, A. Astroviruses as causative agents of poultry enteritis: genetic characterization and longitudinal studies on field conditions. **Avian diseases**, n. 56, v. 1, p. 173-182, 2012.

CATTOLI, G.; DE BATTISTI, C.; TOFFAN, A.; SALVIATO, A.; LAVAZZA, A.; CERIOLI, M.; CAPUA, I. Co-circulation of distinct genetic lineages of astroviruses in turkeys and guinea fowl. **Archives of Virology**, v. 152, p. 595-602, 2007.

CHAKRAVARTI, A.; JAIN, M.; CHAUHAN, M. S.; SHARMA, A.; TEWARI, S. Nosocomial diarrhea in children: is astrovirus the leading pathogen? **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, n. 5, p. 410–411, 2010.

CHAMINGS, A.; HEWSON, K.A.; O' ROURKE, D.; IGNJATOVIC, J.; NOORMOHAMMADI, A. H. High resolution melt curve analysis to confirm the presence of co-circulating isolates of Avian Nephritis Virus in commercial chicken flocks. **Avian Pathology**, v. 443, n. 6, p. 443-451, 2015.

CHU, D. K. W.; POON, L. L. M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. M. Novel astroviruses in insectivorous Bats. **Journal of Virology**, v. 82, n. 18, p. 9107–9114, 2008.

CHU, D. K. W.; CHIN, A. W. H.; SMITH, G. J.; CHAN, K. H.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. M.; POON, L. L. M. Detection of novel astroviruses in urban brown rats and previously known astroviruses in humans. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 10, p. 2457-2462, 2010.

DARRIBA, D.; TABOADA, G. L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772, 2012.

DA SILVA, S. E.; BONETTI, A. M.; PETROCELLI, A. T.; FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C.; CARDOSO, T. C. Detection of Turkey astrovirus in young poult affected with poult enteritis complex in Brazil. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 6, p. 629-31, 2008.

DA SILVA, S. E. L.; BONETTI, A. M.; PETROCELLI, A.; FERRARI, H. F.; LUVIZOTTO, M. C. R.; CARDOSO, T. C. Epidemiological aspects of astrovirus and coronavirus in poult in the south eastern region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 248–253, 2009.

DE BENEDICTIS, P.; SCHULTZ-CHERRY, S.; BURNHAM, A.; CATTOLI, G. Astrovirus infections in humans and animals – Molecular Biology, genetic diversity and interspecies transmissions. **Infection Genetics and Evolution**, v. 11, p. 1529–1544, 2011.

DE WIT, J. J.; DAM, G. B.; DE LAAR, J. M.; BIERMANN, Y.; VERSTEGEN, I.; EDENS, F.; SCHRIER, C. C. Detection and characterization of a new astrovirus in chicken and turkeys with enteric and locomotion disorders. **Avian Pathology**, v.40, p.453–461, 2011.

DOMINGO E.; ESCARMIS, C.; MARTINEZ, M. A; MARTINEZ-SALAS, E.; MATEU, M.

G. Foot and Mouth disease virus population are quasispecies. Em: HOLLAND, J.J.(Ed). Genetic diversity of RNA viruses. **Current topics in Microbiology and Immunology**, v. 176, p. 33-47, 1992.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. RNA virus mutations and fitness for survival. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 51, p. 151-178, 1997.

DOMINGO, E.; SHELDON, J.; PERALES, C. Viral quasispecies evolution. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 159-216, 2012.

DONG, J.; DONG, L.; MENDEZ, E.; TAO, Y. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. **Proceedings of the National Academy of Sciences. U. S. A**, v. 108, p. 12681–12686, 2011.

DONELLI, G.; SUPERTI, F.; TINARI, A.; MARZIANO, M. L. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. **Journal of Medical Virology**, v. 38, n. 4, p. 271-277, 1992.

DREXLER, J. F.; CORMAN, V. M.; WEGNER, T.; TATENO, A. F.; ZERBINATI, R. M.; GLOZA-RAUSCH, F.; SEEBENS, A.; MULLER, M.; DROSTEN, C. Amplification of emerging viruses in a bat colony. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p. 449–56, 2011.

DRYDEN, K. A.; TIHOVA, M.; NOWOTNY, N.; MATSUI, S. M.; MENDEZ, E.; YEAGER, M. Immature and mature human astrovirus: structure, conformational changes, and similarities to hepatitis E virus. **Journal of Molecular Biology**, v. 422, p. 650–658, 2012.

DUBOIS, R. M.; FREIDEN, P.; MARVIN, S.; REDDIVARI, M.; HEATH, R. J.; WHITE. S. W.; SCHULTZ-CHERRY, S. Crystal structure of the avian astrovirus capsid spike. **Journal of Virology**, v. 87, n. 14, p. 7853-7863, 2013.

FINKBEINER, .R.; KIRKWOOD, C. D.; WANG, D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. **Virology Journal**, v. 5, p. 117, 2008.

FINKBEINER, S. R.; LI, Y.; RUONE, S.; CONRARDY, C.; GREGORICUS, N.; TONEY, D.; VIRGIN, H. W.; ANDERSON, L. J.; VINJE, J.; WANG, D.; TONG, S. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. **Journal of Virology**, v. 83, n. 20, p. 10836–10839. 2009.

FU, Y.; PAN, M.; WANG, X.; XU, Y.; XIE, X.; KNOWLES, N. J.; YANG, H.; ZHANG, D. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. **Journal of General Virology**, v. 90, p.1104–1108, 2009.

FUENTES, C.; GUIX, S.; BOSCH, A.; PINTO, R. M. The C-terminal nsP1a protein of human astrovirus is a phosphoprotein that interacts with the viral polymerase. **Journal of Virology**, v. 85, p. 4470-4479, 2011.

FUENTES, C.; BOSCH, A.; PINTO, R. M.; GUIX, S. Identification of human Astrovirus genome linked protein (VPg) essential for virus infectivity. **Journal of Virology**, v. 86, n. 18, p. 10070-10078, 2012.

GELB JR, J.; FRIES, P. A.; PETERSON, F. S. Pathogenicity and cross-protection of pigeon paramyxovirus-1 and Newcastle disease virus in young chickens. **Avian Diseases**, v. 31, n. 3,

p. 601-603, 1987.

GHODASARA PRIYA, D.; PRAKAPATI, K. S.; GHODASARA, D. J.; JOSHI, B. P.; THAKKAR, H.; BANERJEE, J.; PAL, J. K. Isolation and detection of avian nephritis virus by RT-PCR from commercial broiler flocks affected with visceral gout in India. **India Journal of Veterinary Pathology**, v. 39, n. 1, p. 54-57, 2015.

GIBSON, C. A.; CHEN, J.; MONROE, S. A.; DENISON, M. R. Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 440, p. 387-391, 1998.

GOUGH, R. E.; BORLAND, E. D.; KEYMER, I. F.; STUART, J. C. An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. **Avian Pathology**, v.14, p.227–236, 1985.

GUIX, S.; BOSCH, A.; PINTÓ, R. Astrovirus taxonomy. Em SCHULTZ-CHERRY, S. (Ed.). **Astrovirus research: essential ideas, everyday impacts, future directions**. Springer Science+Business Media New York. 2013.

HALL, T. A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HERBERT, T. P.; BRIERLEY, I.; BROWN, T. D. Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 1033-1040, 1997.

HOLMES, E. C. The evolutionary biology of dengue virus. In BOCK, G.; GOODE, J. (Ed.) **New Treatment Strategies for Dengue and Other Flaviviral Diseases: Novartis Foundation Symposium 277**. The Atrium, Southern Gate Chichester. UK: John Wiley & Sons Ltd. 2006. p. 177-192.

HOLTZ, L.R.; WYLIE, K.M.; SODERGREN, E.; JIANG, Y.; FRANZ, C.J.; WEINSTOCK, G.M.; STORCH, G.A.; WANG, D. Astrovirus MLB2 viremia in febrile child. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 2050–2052, 2011.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) 2012. Online. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 25 jun. 2014.

IMADA, T.; YAMAGUCHI, S.; KAWAMURA, H. Pathogenicity for baby chicks of the G-4260 strain of the picornavirus “avian nephritis virus”. **Avian Diseases**, v. 23, p. 582–588, 1979.

IMADA, T.; TANIGUCHI, T.; YAMAGUCHI, S.; MINETOMA, T.; MAEDA, M.; KAWAMURA, H. Susceptibility of chickens to avian nephritis virus at various inoculation routes and ages. **Avian Diseases**, v. 25, p. 294–302, 1981.

IMADA, T.; MAEDA, M.; FURUTA, K.; YAMAGUCHI, S.; KAWAMURA, H. Pathogenicity and distribution of avian nephritis virus (G-4260 strain) in inoculated laying hens. **National Institute of Animal Health Q (Tokyo)**, v. 23, p. 43–48. 1983.

IMADA, T., YAMAGUCHI, S., MASE, M., TSUKAMOTO, K., KUBO, M., MOROOKA, A. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. **Journal of Virology**, n. 74, p. 8487–8493, 2000.

- JANG, S. Y.; JEONG, W. H.; KIM, M. S.; LEE, Y. M. ; LEE, J. L.; LEE, G. C.; PAIK, S. Y.; KOH, G. P.; KIM, J. M.; LEE, C. H. Detection of replicating negative sense RNAs in CaCo-2 cells infected with human astrovirus. **Archives of Virology**, v.155, n. 9, p. 1383-1389, 2010
- JIANG, B.; MONROE, S. S.; KOONIN, E. V.; STINE, S. E.; GLASS, R. I. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 90, n. 22, p. 10539-10543, 1993
- JIANG, H.; HOLTZ, L. R.; BAUER, I.; FRANZ, C. J.; ZHAO, G.; BODHIDATTA, L.; SHRESTHA, S. K.; KANG, G.; WANG, D. Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. **Virology**, v. 436, n. 1, p. 8-14, 2013
- JONASSEN, C. M., JONASSEN, T. T.; SVEEN, T. M.; GRINDE, B. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: comparison with related viruses. **Virus Research**, v. 91, n. 2, p. 195-201, 2003
- JONES, D. H., WINISTORFER, S. C. Sequence specific generation of a DNA panhandle permits PCR amplification of unknown flanking DNA. **Nucleic Acids Research**, n. 11, v. 3, p. 595-600, 1992
- KANG, K. I.; ICARD, A. H.; LINNEMANN, E.; SELLERS, H. S.; MUNDT, E. Determination of the full-length sequence of a chicken astrovirus suggests a different replication mechanism. **Virus Genes**, v. 44, n.1, p.45-50, 2012
- KAPOOR, A.; LI, L.; VICTORIA, J.; ODERINDE, B.; MASON, C.; PANDEY, P.; ZAIDI, S. Z.; DELWART, E. Multiple novel astrovirus species in human stool. **Journal of General Virology**, v. 90, p. 2965-2972, 2009.
- KOCI, M. D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Avian astroviruses. **Avian Pathology**, v.31, p.213-227, 2002.
- KOCI, M. D., MOSER, L. A., KELLEY, L. A., LARSEN, D., BROWN, C. C., SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. **Journal of Virology**, v. 77, p. 11798-11808, 2003
- KRISHNA, N. K. Identification of structural domains involved in astrovirus capsid biology. **Viral Immunology**, v. 18, p.17-26, 2005
- LAN, D.; JI, W.; SHAN, T.; CUI, L.; YANG, Z.; YUAN, C.; HUA X. Molecular characterization of a porcine astrovirus strain in China. **Archives of Virology**, v. 156, n. 10, p. 1869-1875, 2011
- LAURIN, M. A.; DASTOR, M.; L'HOMME, Y. Detection and genetic characterization of a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses. **Archives of Virology**, v.156, p. 2095-2099, 2011
- LEE, T. W.; KURTZ, J. B. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. **Journal of General Virology**, v. 57, p. 412-424, 1981
- LEE, C. M.; BIH, F. Y.; CHAO, Y. C.; GOVINDARAJAN, S.; LAI, M. M. C. Evolution of

hepatitis delta virus RNA during chronic infection. **Virology**, v. 188, p. 265-273, 1992

LIU, M. Q.; PENG, J. S.; TANG, L.; ZHOU, Y.; YANG, B. F.; WANG, Y. H.; WANG, B.; ZHOU, D. J.; HUANG, H. J.; HO, W. Z. Identification of new subtype of astrovirus type 3 from an infant with diarrhea in Wuhan, China. **Virology**, v. 375, p. 301–306, 2008

LUO, Z.; ROI, S.; DASTOR, M.; GALLICE, E.; LAURIN, M. A.; L'HOMME, Y. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 3-4, p. 316-323, 2011

LUKASHOV, V. V.; GOUDSMIT, J. Evolution relationship among Astroviridae. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 6, p. 1397-1405, 2002

MAEDA, M.; IMADA, T.; TANIGUCHI, T.; HORIUCHI, T. Pathological changes in chicks inoculated with the picornavirus “avian nephritis virus”. **Avian Diseases**, v. 23, p. 589–596, 1979

MARTELLA, V.; PINTO, P.; TUMMOLO, F.; DE GRAZIA, S.; GIAMMANCO, G. M.; MEDICI, M. C.; GANESH, B.; L'HOMME, Y.; FARKAS, T.; JAKAB, F.; BANYAI, K. Analysis of the ORF2 of human astroviruses reveals lineage diversification, recombination and rearrangement and provides the basis for a novel sub-classification system. **Archives of Virology**, v. 159, n. 12, p. 3185-3196, 2014

MATSUI, S. M.; GREENBERG, H. B. Astroviruses. Em FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.) **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott–Raven, 1996. p. 811–824

MCNEILLY, F.; CONNOR, T. J.; CALVERT, V. M.; SMYTH, J. A.; CURRAN, W. L.; MORLEY, A. J.; THOMPSON, D.; SINGH, S.; MCFERRAN, J. B.; ADAIR, B. M.; MCNULTY, M. S. Studies on a new enterovirus-like virus isolated from chickens. **Avian Pathology**, v. 23, n. 2, p.313-327, 1994

MEDINA, S. M.; GUTIERREZ, M. F.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J. E. Identification and type distribution of astroviruses among children with gastroenteritis in Colombia and Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3481–3483, 2000

MENDEZ-TOSS, M.; ROMERO-GUIDO, P.; MUNGUÍA, M. E.; MENDEZ, E.; ARIAS, C. F. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 12, 2891-2897, 2000

MENDEZ, E.; FERNANDEZ LUNA, T.; LOPEZ, S.; MENDEZ-TOSS, M.; ARIAS, C. F. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. **Journal of Virology**, v. 76, n. 16, p. 7996-8002, 2002

MENDEZ, E.; SALAS-OCAMPO, M. P.; MUNGUÍA, M. E.; ARIAS, C. F. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. **Journal of Virology**, v. 77, p. 11378–11384, 2003

MÉNDEZ, E.; ARIAS, D. F. Astroviridae . Em: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN. B.; STRAUS. S.E. (Eds). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 981-1000.

MENDEZ, E.; MURILLO, A.; VELAZQUEZ, R.; BURNHAM, A.; ARIAS, C. F.

Replication Cycle of Astroviruses. Em SCHULTZ-CHERRY, S. (Ed.) **Astrovirus Research: Essential ideas, Everyday Impacts. Future Directions**. Springer Science+Business Media New York. 2013.p. 19-46

METTIFOGO, E.; NUNEZ, L. F. N.; CHACON, J. L., SANTANDER PARRA, S.H., ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; JEREZ, J. A.; JONES, R. C.; PIANTINO FERREIRA; A. J. Emergency of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

MONROE, S. S.; STINE, S. E.; GORELKIN, L.; HERRMANN, J. E.; BLACKLOW, N. R.; GLASS, R. I. Temporal synthesis of proteins and RNAs during human astrovirus infection of cultured cells. **Journal of Virology**, v.65, n. 2, p. 641-648, 1991

MOSER, L. A.; CARTER, M.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. **Journal of Virology**, v. 81, n. 21, p. 11937-11945, 2007

MOSER, L. A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Suppression of astrovirus replication by an ERK1/2 inhibitor. **Journal of Virology**, v. 82, n. 15, p. 7475-7482, 2008

MOURA-ALVAREZ, J.; CHACON, J. V.; SCANAVINI, L. S.; NUÑEZ, L. F., ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; JONES, R. C.; PIANTINO FERREIRA, A.J. Enteric viruses in Brazilian turkey flocks: single and multiple virus infection frequency according to age and clinical signs of intestinal disease. **Poultry Science**, v. 92, n. 4, p. 945-955, 2013

MOURA-ALVAREZ, J.; NUÑEZ, L. F.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; KNÖBL, T.; CHACÓN, J. L.; MORENO, A. M.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. Detection of enteric pathogens in Turkey flocks affected with severe enteritis, in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n.6, p.1051-1058, 2014

NOVELLA, I. S.; CLARKE, D. K.; QUER, J.; DUARTE, E. A.; LEE, C. H. Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. **Journal of Virology**, v. 69, p. 6805-6809, 1995

PANIGRAHY, B.; SENNE, D. A.; PEDERSEN, J. C.; SHAFER, A. L.; PEARSON, J. E. Susceptibility of pigeons to avian influenza. **Avian diseases**, v. 40, n. 3, p. 600-604, 1996

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; WOOLCOCK, P. R. Molecular characterization and typing of chicken and turkey astroviruses circulating in the United States: implications for diagnostics. **Avian Diseases**, v. 2, p. 50, p. 397-404, 2006

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; STROTHER, K. O.; MUNDT, E.; DAY, J. M.; SPACKMAN, E. Molecular characterization of avian astroviruses. **Archives of Virology**, v. 156, p. 235-244, 2011

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; TODD, M.; KOCI, M. Avian astroviruses, p.151-180. Em SCHULTZ-CHERRY, S. **Astrovirus Research: Essential Ideas, Everyday Impacts, Future Directions**. Springer Science+Business Media, New York. 2013

PORTER JR., R. E. Bacterial Enteritides of Poultry. **Poultry Science**. v. 77, p 1159-1165, 1998

QUAN, P. L.; WAGNER, T. A.; BRIESE, T.; TORGERSON, T. R.; HORNIG, M.; TASHMUKHAMEDOVA, A.; FIRTH, C.; PALACIOS, G. BAISRE DE LEON, A.; PADDOCK, C. D.; HUTCHISON, S. K.; EGHOLM, M.; ZAKI, S. R.; GOLDMAN, J. E.; OCHS, H. D.; LIPKIN, W. I. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. **Emerging Infection Diseases**, v. 16, n. 6, p. 918–925, 2010

RAMIREZ, B. C.; BARBIER, P.; SERON, K.; HAENNI, A. L.; BERNARDI, F. Molecular mechanism of point mutations in RNA viruses. Em: GIBBS, A.; CALISHER, C. H.; GARCIA-ARENAL, F (Eds). **Molecular Basis of Virus Evolution**. Cambridge University Press. Cambridge. UK, p. 105-118, 2005.

REUTER, G.; PANKOVICS, P.; BOROS, A. Identification of a novel astrovirus in a domestic pig in Hungary. **Archives of Virology**, v. 156, p. 125–128, 2011

RIVERA, R.; NOLLENS, H. H; VENN-WATSON, S.; GULLAND, F. M.; WELEHAN JR, J. F. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 166-173, 2010

SANCHEZ-FAUQUIER, A.; CARRASCOSA, A. L.; CARRASCOSA, J. L.; OTERO, A.; GLASS, R. I.; LOPEZ, J. A.; SAN MARTIN, C.; MELERO, J. A. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. **Virology**, v. 201, n. 2, p. 313-320, 1994

SHAN, T.; LI, L.; SIMMONDS, P.; WANG, C.; MOESER, A.; DELWART, E. The fecal virome of pigs on a highdensity farm. **Journal of Virology**, v. 85, p.11697–11708, 2011

SHIRAI, J.; NAKAMURA, K.; SHINOHARA, K.; KAWAMURA, H. Pathogenicity and antigenicity of avian nephritis isolates. **Avian Diseases**, v. 35, p.49–54, 1991

SHIRAI, J.; TANIMURA, N.; URAMOTO, K.; NARITA, M.; NAKAMURA, K.; KAWAMURA, H. Pathologically and serologically different avian nephritis virus isolates implicated in etiology of baby chick nephropathy. **Avian Diseases**, v. 36, p. 369–377, 1992

SMYTH, V. J.; JEWURST, H. L.; ADAIR, B.M.; TODD, D. Detection of chicken astrovirus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **Avian Pathology**, v. 38, p. 293–299, 2009

SMYTH, V.; TRUDGETT, J.; WYLIE, M.; JEWURST, H.; CONWAY, B.; WELSH, M.; KAUKONEN, E.; PERKO-MAKELA, P. Chicken astrovirus detected in hatchability problems associated with 'white chicks'. **Veterinary Record**, v. 173, n. 16, p. 403-404, 2013

SNODGRASS, D. R.; GRAY, E. W. Detection and transmission of 30 nm virus particles (astroviruses) in faeces of lambs with diarrhoea. **Archives of Virology**, v. 55, p.287–291, 1977

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

STRAIN, E.; KELLEY, L.A.; SCHULTZ-CHERRY, S.; MUSE, S. V.; KOCI, M. D. Genomic analysis of closely related astroviruses. **Journal of Virology**, v. 82, p. 5099-5103, 2008

- TAI J. H.; EWERT, M. S.; BELLLOT, G.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Development of a rapid method using nucleic acid sequence based amplification for the detection of astrovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 110, n. 2, p. 119–127, 2003
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-9, 2011
- TAKASE, K.; SHINOHARA, K.; TSUNEYOSHI, M.; YAMAMOTO, M.; YAMADA, S. Isolation and characterization of cytopathic avian enteroviruses from broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 18, p. 631–642, 1989
- TANG, Y.; SAIF, Y. M. Antigenicity of two turkey astrovirus isolates. **Avian Diseases**, v. 48, p. 896–901, 2004
- TSE, H.; CHAN, W. M.; TSOI, H. W.; FAN, R. Y.; LAU, C. C.; LAU, S. K.; WOO, P. C.; YUEN, K. Y. Rediscovery and genomic characterization of bovine astroviruses. **Journal of General Virology**, v. 92, p. 1888–1898, 2011
- TODD, D.; SMYTH, V. J.; BALL, N. W.; DONNELLY, B. M.; WYLIE, M.; KNOWLES, N. J.; ADAIR, B. M. Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as astroviruses. **Avian Pathology**, v. 38, n. 1, p. 21-30, 2009
- TODD, D.; TRDGETT, J. S.; SMYTH, V. J.; DONNELLY, B. M.; MCBRIDE, N. S.; WELSH, M. D. Capsid protein sequence diversity of avian nephritis virus. **Avian Pathology**, v. 40, n. 3, p. 249-259, 2011
- UBABEF. Relatório anual da União brasileira de avicultura. 2012. Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/files/publicacoes/d220421fe22b294a31a584138b5fda95.pdf>>. Acesso em: 20 Agosto. 2014
- ULLOA, J. C.; GUTIÉRREZ, M. F. Genomic analysis of two ORF2 segments of new porcine astrovirus isolates and their close relationship with human astroviruses. **Canadian Journal of Microbiology**, v.56, p.569–757, 2010
- VAN HEMERT, F. J.; BERKHOUT, B.; LUKASHOV, V. V. Host related nucleotide composition and codon usage as driving forces in the recent evolution of the Astroviridae. **Virology**, v. 361, n. 2, p. 447-454, 2007
- VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. New York: Academic Press. 2000
- VILLARREAL, L. Y. B.; ASSAYAG, M. S. I. BRANDÃO, P. E.; CHACÓN, J. L.; BUNGER, A. N. D.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; GOMES, C. R.; JONES, R. C.; FERREIRA, A. J. P. Identification of turkey astrovirus and turkey coronavirus in an outbreak of poult enteritis and mortality syndrome. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v. 8, n. 2, p. 131-135, 2006
- WALTER, J. E.; BRIGGS, J.; GUERRERO, M. L.; MATSON, D. O.; PICKERING, L. K.; RUIZ-PALACIOS, G.; BERKE, T.; MITCHELL, D. K. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. **Archives**

of **Virology**, v. 146, p. 2357-2367, 2001

WILLCOCKS, M. M.; BROWN, T. D.; MADELEY, C. R.; CARTER, M. J. The complete sequence of a human astrovirus. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1785–1788, 1994

WOLFAARDT, M.; KIULIA, N. M.; MWENDA, J. M.; TAYLOR, M. B. Evidence of a recombinant wild-type human astrovirus strain from a Kenyan child with gastroenteritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, p. 728-731, 2011

XIAO, J.; LI, J.; HU, G.; CHEN, Z.; WU, Y.; CHEN, Y.; CHEN, Z.; KE, X.; MA, L.; LIU, S.; ZHOU, J.; DAI, Y.; CHEN, H.; YU, S.; CHEN, Q. , et al. Isolation and phylogenetic characterization of bat astroviruses in southern china. **Archives of Virology**, v.156, p.1415–1423, 2011

YAMAGUCHI, S.; IMADA, T.; KAWAMURA, H. Characterization of a picornavirus isolated from broiler chicks. **Avian Diseases**, v.23, p. 571-581, 1979

ZHAO, W.; HUA, X.G.; YUAN, L.; CUI, L.; SHAN, T. L.; DAI, X. Q.; ZHU, A. L.; YU, Y.; ZHU, C. X.; YANG, Z. B. Sequence analyses of the representative Chinese-prevalent strain of avian nephritis virus in healthy chicken flocks. **Avian Diseases**, v. 55, p. 65–69. 2011a

ZHAO, W.; ZHU, .A. L.; YU, Y.; YUAN, C. L.; ZHU, C. X.; YANG, Z. B.; CUI, L.; HUA, X. G. Complete sequence and genetic characterization of pigeon avian nephritis virus, a member of the family *Astroviridae*. **Archives of Virology**, v.156, p. 1559–1565. 2011b

Apêndice A - Árvore filogenética de genótipos de astrovírus das sequências de aminoácidos do gene *ORF2*, considerando as sequências do estudo, sequências para análises de diversidades e sequências para análise do genótipo. As sequências do estudo são identificadas com um triângulo preto. A árvore foi construída usando Máxima Verossimilhança, com o modelo de substituição LG+G+F