LAÍS SANTOS RIZOTTO

Metapneumovírus aviários em aves silvestres

Pirassununga

2017

LAÍS SANTOS RIZOTTO

Metapneumovírus aviários em aves silvestres

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profª. Drª. Helena Lage Ferreira

Pirassununga

2017

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. 3468
FMVZ

Rizotto, Laís Santos
Metapneumovírus aviários em aves silvestres / Laís Santos Rizotto. -- 2017.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Pirassununga, 2017.

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

Orientador: Profa. Dra. Helena Lage Ferreira.

1. Epidemiologia. 2. Biologia Molecular. 3. Virologia. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização Molecular dos Metapneumovírus Aviários por Sequenciamento de Última Geração - NGS", protocolada sob o CEUA nº 4107011214, sob a responsabilidade de **Helena Lage Ferreira** *e equipe; Laís Santos Rizotto* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/04/2016.

We certify that the proposal "Molecular Characterization of Metapneumovirus Aviaries for Next-Generation Sequencing - NGS", utilizing 150 Birds (150 females), protocol number CEUA 4107011214, under the responsibility of **Helena Lage Ferreira** *and team; Laís Santos Rizotto* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/14/2016.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 02/2015 a 12/2016 Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Origem:	Não aplicável biotério						
Espécie:	Aves	sexo:	Fêmeas	idade:	a	N:	150
Linhagem:	N/A			Peso:	a		

Resumo: A avicultura brasileira produz toneladas de carne de frango anualmente e contribui com cerca de 1,5% para ao PIB (Produto Interno Bruto). Vírus que acometem o trato respiratório das aves, como os metapneumovírus, comprometem o crescimento e consequentemente baixam o rendimento no abate, além de reduzir a produção e qualidade dos ovos. Os metapneumovírus já foram identificados em aves silvestres de diversos países e, quando acometem aves domésticas são responsáveis por grandes prejuízos econômicos. Apesar disso, pouco se sabe sobre a circulação desses vírus no país e, principalmente, nas regiões onde há grande produção avícola. O presente estudo tem como principal objetivo avaliar a circulação dos metapneumovírus aviários pertencentes à família Paramyxoviridae, já detectados em aves silvestres através da utilização de testes moleculares e realizar a análise genética de suas principais proteínas (F, G e SH), a fim de caracterizar os variantes circulantes presentes nas aves silvestres. Para tanto, serão coletadas amostras de suabes orofaringeanos e cloacais de 150 aves silvestres no estado de São Paulo que serão submetidas à técnica de RRT-PCR para detectar potenciais agentes no material. Feito isso, serão selecionadas dez amostras dadas como positivas pelo RRT-PCR para serem cultivadas em células CER (chicken related cell line). Após, as amostras serão purificadas e amplificadas conforme o método DNAse SISPA e, após a amplificação, os fragmentos de DNA maiores que 400 bp, visualizados em gel de agarose 1%, serão cortados, purificados, quantificados e submetidos ao sequenciamento de última geração NGS. Os dados das sequências obtidas serão montados com o programa SeqMan NGen® versão 3.1 e a qualidade das sequências obtidas será avaliada pelo programa Sequence Scanner Software 2. As sequências de nucleotídeos senso e antisenso serão manipuladas utilizando o programa Bioedit Sequence Alignment Editor versão 7.1.11 alinhadas usando o programa Clustal W no programa MEGA versão 6.0, e a similaridade das sequências comparada com sequências depositadas no GenBank. Finalmente, o presente estudo será de grande importância para enriquecer nossos conhecimentos sobre diferentes metapneumovírus aviários que circulam em aves silvestres no Brasil.

Local do experimento:

São Paulo, 26 de janeiro de 2017

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

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 16 de agosto de 2016
CEUA N 4107011214

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Helena Lage Ferreira
Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal
Helena Lage Ferreira (orientador)

Título da proposta: "Caracterização Molecular dos Metapneumovírus Aviários por Sequenciamento de Última Geração - NGS".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 19/julho/2016) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Após o exame de qualificação, a banca sugeriu e pediu que fosse alterado o nome do projeto para "Metapneumovírus Aviários em Aves Silvestres" por se encaixar melhor nos objetivos, metodologia e resultados parciais do trabalho.".

Comentário da CEUA: "Solicitação de mudança de título por banca de qualificação.".

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

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RIZOTTO, Laís Santos

Título: **Metapneumovírus aviários em aves silvestres**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, que sempre me fez grande aos seus olhos, dedico.

.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, me ajudando em cada conquista, e colocando tantas pessoas incríveis na minha vida.

A minha família, que sempre me apoiou e deu todo o suporte quando preciso. Ao meu pai que sempre acreditou, incentivou e ainda incentiva muito essa história de me tornar cientista. Espero um dia conseguir ler todos os livros que leu e me indicou e ser tão inteligente quanto você! Freud explica... Minha mãe que sempre esteve presente dentro de mim. Ao meu irmão príncipe, Matheus, com seus olhinhos pequenos e coração enorme. A minha irmãzinha Bibi, que é a menina mais linda e doce que eu conheço! Sinto falta de vocês todos os dias! Muito obrigada por se fazerem sempre presentes desde que sai de casa e pelos momentos super divertidos que passamos quando estamos juntos, amo vocês demais! A minha madrinha, por estar sempre ao meu lado e ser uma grande inspiração!

A minha orientadora, professora Helena, que tenho grande admiração! Me faltam palavras para descrever o quão incrível vejo sua caminhada. Muito obrigada por sempre insistir no pensamento crítico e ser tão presente no meu crescimento científico. Por me permitir conhecer e descobrir tantas coisas, pessoas e lugares. Muito obrigada pela confiança e por acreditar em mim.

A todos que são e foram do laboratório, principalmente João, Bruna, Jéssiquinha, Iza, Van, Nuno, Mari, Ale, que fizeram a rotina ser tão leve e divertida! Em especial a Júlia, técnica que cuida não só do laboratório, mas principalmente de todos nós! Sempre com um conselho ou palavra de acalento nos momentos certos e nos necessários. Ao Rapha, meu super parceiro de todas as horas! Que levou o termo ‘dedicação exclusiva’ tão a sério quanto eu. Muito obrigada pelo companheirismo, por ter formado essa dupla imbatível comigo. Ao Gui, sempre tão disposto a ajudar e por me mostrar, ainda que sem querer, que está tudo bem não ser uma pessoa matinal!

A Crys, minha companheira de casa e de resultados desesperadores! Obrigada por ouvir minhas preocupações e dividir as suas.

Aos amigos pós-graduandos que fiz durante o mestrado e que me mostraram que podemos ser vistos fora do laboratório! Mel, Ceará, Lele, Brendinha, obrigada por toda a diversão! Em especial, meu amigo alma gêmea, como você mesmo disse, Danilo! Obrigada pelas gargalhadas, pelos momentos de felicidade e de dureza, por

ter sido tão presente e companheiro nessa jornada! Espero ter você pra sempre em minha vida!

A Gi, minha amiga irmã desde o primeiro dia de graduação que divide comigo suas crises e ambições. Que nossa confiança, sintonia e respeito perdurem! Amo você.

A professora Clarice por ter me cedido algumas amostras, ter permitido que algumas etapas do projeto fossem realizadas em seu laboratório e ter sido tão agradável todas as vezes que conversamos.

Ao querido professor Durigon, que cedeu suas amostras e que sem saber renovou minha esperança! Muito obrigada.

A enérgica Dani, por abrir seu laboratório para mim e por toda solícita ajuda!

Ao professor Brandão por auxiliar, sempre que possível.

Ao meu primeiro orientador, professor Paiva, pelos ensinamentos, por ter me mostrado esse incrível mundo de descobertas que é a pesquisa e por ter me incentivado a entrar, naquele momento desconhecido, mundo dos vírus.

A FAPESP por ter financiado o projeto e a CAPES pelo financiamento da bolsa.

A todos que colaboraram de maneira ativa ou indireta para a realização desse trabalho, que contribuíram para meu crescimento pessoal, muito obrigada!

“Trago dentro do meu coração,
Como num cofre que se não pode fechar de cheio,
Todos os lugares onde estive,
Todos os portos a que cheguei,
Todas as paisagens que vi através de janelas ou vigias,
Ou de tombadilhos, sonhando,
E tudo isso, que é tanto, é pouco para o que eu quero”

Álvaro de Campos – Passagem das Horas

RESUMO

RIZOTTO, L. S. **Metapneumovírus aviários em aves silvestres**. [Avian Metapneumovirus in Wild Birds]. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Metapneumovírus Aviário (aMPV), família Pneumoviridae, gênero *Metapneumovírus*, é o agente etiológico responsável pela rinotraqueíte dos perus e também está associada à síndrome da cabeça Inchada em galinhas, duas importantes doenças respiratórias que acometem aves comerciais e levam a grandes perdas econômicas. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de aMPV em amostras de aves silvestres e realizar a caracterização molecular dos isolados encontrados, com o intuito maior de contribuir para o entendimento da epidemiologia desse vírus. Para isso foram coletados no total, 448 suabes orofaringeanos (OP) e cloacais (C) oriundos de 234 aves silvestres em quatro locais do estado de São Paulo. Três tipos de amostras foram processadas e testadas: 1) 266 suabes agrupados de um ou até cinco animais que estavam no mesmo recinto e respeitando o mesmo tipo de suabe (OP ou C); 2)188 suabes foram agrupados na forma de *pools* de até dois animais, contendo os suabes OP e C de cada animal, formando então 48 *pools*; 3) amostras de tecido traqueal e pulmonar de três *Egretta thula* também foram coletados e testados. A purificação de RNA viral foi realizada utilizando o QIAmp RNA Mini Kit Kit (Qiagen). Para o teste de RT-PCR foi utilizado o kit OneStep RT-PCR (Qiagen) com *primers* baseados no gene N, previamente descritos, com fragmento esperado de 115 bp. As amostras foram também testadas por RT-PCR em tempo real (RRT-PCR) com *primers* específicos previamente descritos, para os subtipos A e B, com base no gene G com fragmentos de 116 e 135 bp, respectivamente. Os fragmentos das amostras positivas foram purificados e sequenciados pelo sequenciamento tipo Sanger para caracterização por análises filogenéticas. Das 126 amostras testadas pelo teste de RT-PCR baseado no gene N, quatorze foram positivas: oito amostras de Anseriformes (*Aix sponsa, Aix galericulata, Dendrocygna viduata*), três de Columbiformes (*Columba livia*), um de Falconiformes (*Falco sparverius*), um de Psittaciformes (*Psittacara leucophthalma)* e um de Pelecaniformes (*Egretta thula*). Das quatorze amostras positivas, treze eram provenientes de suabes, e a décima quarta era oriunda de tecido

traqueal de *Egretta thula*. Pelo teste de RRT-PCR baseado no gene G nenhuma das 184 amostras testadas foi positiva. As análises filogenéticas realizadas com fragmentos de 44 e 54 bp do gene N de duas amostras positivas, que se agruparam com isolados pertencentes ao aMPV de subtipo A. Estes vírus apresentaram alta identidade com as estirpes derivadas de vacina e com estirpes vacinais, o que mostra uma possível ocorrência de escapes vacinais de aves de produção para as aves silvestres.

Palavras-chave: Epidemiologia. Biologia Molecular. Virologia

ABSTRACT

RIZOTTO, L. S. Avian Metapneumovirus in Wild Birds. [Metapneumovírus Aviários em Aves Silvestres]. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Avian metapneumovirus (aMPV), family Pneumoviridae, genus Metapneumovirus, it is the etiologic agent responsible for turkey rhinotracheitis and is also associated with swollen head syndrome in chickens, two important respiratory diseases in poultry which leads to large economic losses. The aim of this study was detect the presence of aMPV in wild birds samples, to perform the phylogenetic analysis of the isolates found with the major objective of contributing to the understanding of the epidemiology of this virus in poultry farms. In total, 448 oropharyngeal (OP) and cloacal (C) swabs from 234 wild birds collected in four different locations within the state of São Paulo. The samples were processed and tested in three different ways: 1) 266 swabs were in the form of pools of one up to five animals that were in the same enclosure and respecting the same type of swab (OP or C); 2) 188 remaining swabs were grouped into pools of up to two animals, containing the oropharyngeal and cloacal swabs of each animal; 3) tracheal and pulmonary tissue samples were also collected and tested. Purification was performed using the QIAmp RNA Mini Kit Kit (Qiagen). Viral detection was performed by conventional RT-PCR technique using the OneStep RT-PCR kit (Qiagen) with primers based on the N gene, previously described with expected fragment of 115 bp. The samples were also tested by a real time RT-PCR (RRT-PCR) with specific primers previously described, for subtypes A and B, based on the G gene with fragments of 116 and 135 bp, respectively. Of the 126 samples tested by the RT-PCR N gene based, fourteen were positive: eight samples of Anseriformes (*Aix sponsa, Aix galericulata, Dendrocygna viduata*), three Columbiformes (*Columba livia*), one Falconiformes (*Falco sparverius*), one Psittaciformes (*Psittacara leucophtalma*) and one Pelecaniformes *(Egretta thula*). Of the swab samples, five were derived from oropharyngeal swabs and four from cloacal swabs, the other four samples were detected in the samples processed in pools of up to two animals, which contained the oropharyngeal and cloacal swabs of each bird. The positive *Egretta thula* sample was from a tracheal tissue sample. Based on the RRT-PCR G gene based, none of the 184 samples tested were detected. Phylogenetic analyzes were performed on two positive

samples that proved to belong to aMPV subtype A, showing high similarity with the strains derived from the vaccine and with vaccine strains.

Keywords: Surveillance. Molecular Biology. Virology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética utilizando 200 aminoácidos da região da proteína da polimerase (L) dos Mononegavirales pelo método Neighbour-joining apresentando os representantes da Ordem dos Mononegavirales agrupados em diferentes clusters (famílias).....21
Figura 2. Genoma do Metapneumovírus Aviário (aMPV).....22
Figura 3. Partícula viral de um Metapneumovírus Aviário 23
Figura 4. Ilustração esquemática dos processos de transcrição e replicação dos Metapneumovírus.....26
Figura 5. Árvores filogenéticas baseadas nos genes F e M identificando os quatro metapneumovírus.....27
Figura 6. Relações genéticas entre as sequências completas dos genomas de Metapneumovírus previamente publicadas.....30
Figura 7. Detecção de amostras positivas para obtenção de fragmentos com tamanho de 115pb pelo teste RT-PCR baseado no gene N e visualizadas em gel de agarose a 2% 50
Figura 8. Cromatograma dos fragmentos obtidos e avaliados pelo programa SeqScanner Software 52
Figura 9. BLAST dos fragmentos das amostras sequenciadas apresentando sequências semelhantes.....53
Figura 10. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da amostra *Aix galericulata* e das sequências de aMPV.....54
Figura 11. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da amostra *Egretta thula* e das sequências de aMPV 55
Figura 12. Perfil de aminoácidos dos fragmentos obtidos e das sequências de aMPV alinhadas.....56
Figura 13. Árvore filogenética contendo o fragmento da amostra de *Aix galericulata* 57
Figura 14. Árvore filogenética contendo o fragmento da amostra de *Egretta thula*...58
Figura 15. Árvore filogenética contendo sequências de aMPV 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de amostras testadas quanto a espécie, número de aves, quantidade e tipo de suabe e origem 41
Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos e sondas utilizados com seus respectivos genes alvo 45
Tabela 3. Amostras positivas inoculadas em ovos embrionados de galinha.....46
Tabela 4. Amostras positivas por RT-PCR baseada no gene N para aMPV.....49

LISTA DE ABREVIAÇÕES

aMPV	*Avian Metapneumovirus*
BHI	*Brain Heart Infusion*
C	Cloacal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEGH-CEL	Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células Tronco
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
F	Fusão
G	Glicoproteína
hMPV	*Human Metapneumovirus*
hRSV	Vírus Sincicial Respiratório Humano
IBV	Vírus da Bronquite Infecciosa
ICB-II	Instituto de Ciências Biomédicas
ICTV	*International Committee on Taxonomy of Viruses*
L	RNA polimerase dependente de RNA
M	Matriz
mAbs	Anticorpos monoclonais
Mg	Magnésio
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
$MgSO_4$	Sulfato de Magnésio
mRNA	RNA mensageiro
M2	Segunda Matriz
N	Nucleoproteína
NDV	N*ewcastle Disease Virus*
NNS	*RNA nonsegment negative strand*
OP	Orofaringeano
ORF	*Open Reading Frame*
P	Fosfoproteína
RdRP	RNA polimerase RNA dependente
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
RRT-PCR	*Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SPF	*Specific Pathogen Free*
SH	Hidrofóbico Pequeno
U	Uracila
TOC	Cultura de Tecido Traqueal
USP	Universidade de São Paulo
UV	Luz Ultravioleta
VSV	Vírus da Estomatite Vesicular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18

2 REVISÃO DE LITERATURA 20

2.1 CLASSIFICAÇÃO VIRAL 20
2.2 ESTRUTURA VIRAL 21
2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA 26
2.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS aMPV 30
2.5 AS AVES SILVESTRES 32
2.6 SINAIS CLÍNICOS 33
2.7 DIAGNÓSTICO 34
2.8 CONTROLE 36

3 OBJETIVOS 38

3.1 GERAL 38
3.2 ESPECÍFICOS 38

4 MATERIAIS E MÉTODOS 39

4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS 39
4.1.1 Suabes 39
4.1.2 Amostras de *Egretta thula* após um surto 42
4.2 AMOSTRAS PADRÃO 42
4.3 PURIFICAÇÃO DO RNA VIRAL 43
4.4 REAÇÃO DE RT-PCR CONVENCIONAL BASEADA NO GENE N 43
4.5 VALIDAÇÃO DO TESTE DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RRT-PCR) 44
4.6 REAÇÃO DE RRT-PCR BASEADA NO GENE G 44
4.7 ISOLAMENTO VIRAL 45
4.8 SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS 46
4.9 ANÁLISES DE DADOS E FILOGENÉTICA 47

5 RESULTADOS 48

5.1 REAÇÃO DE RT-PCR CONVENCIONAL BASEADA NO GENE N 48
5.2 VALIDAÇÃO DO TESTE DE RRT-PCR 50
5.3 REAÇÃO DE RRT-PCR BASEADA NO GENE G 51
5.4 SEQUENCIAMENTO, ANÁLISE DE DADOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA 51

6 DISCUSSÃO 59

7 CONCLUSÕES 64

8 REFERÊNCIAS 65

1 INTRODUÇÃO

Embora tenha ocorrido uma mudança no comportamento de consumo e interesse da população quanto ao tipo de criação das aves, a criação intensiva só tem aumentado seus números de produção. Segundo o último relatório da Associação Brasileira de Proteína Animal, a produção mundial de carne de frango e de peru foi de 91.222 mil toneladas, desse montante, o Brasil contribuiu com a produção de 13.018 mil toneladas, alcançando o 3º lugar na produção de carne de frango e de peru (UBABEF, 2015). No mercado de exportação o país também participou ativamente, exportando 4.099 mil toneladas de carne de frango e 125 mil toneladas de carne de peru, atingindo a 1ª e a 3ª posição, respectivamente, nesse segmento (UBABEF, 2015). Tal posição de destaque contribui significativamente para o abastecimento mundial e para a economia brasileira, portanto, é imperativo o monitoramento da sanidade dos plantéis avícolas.

Diversos patógenos ameaçam a produção avícola do país e, consequentemente, sua economia. Dentre eles, os vírus que desenvolvem sintomatologia respiratória merecem destaque pois comprometem o crescimento das aves, diminuem o rendimento de carcaça no abate, reduzem a produção e qualidade dos ovos, além de causarem consideráveis taxas de morbidade e mortalidade. Indiretamente, tais vírus também aumentam os gastos com diagnósticos e medicamentos, tanto para o combate doença em si, quanto no tratamento de doenças secundárias causadas por agentes oportunistas.

Os metapneumovírus aviários (aMPV) pertencentes ao gênero *Metapneumovírus*, família Pneumoviridae, compõem o quadro de principais patógenos respiratórios que acometem as aves comerciais, levando à grandes prejuízos econômicos. As aves silvestres, especialmente aves aquáticas migratórias, e passeriformes, são frequentemente consideradas reservatórios ou até mesmo vetores de patógenos aviários de grande importância para as aves comerciais, inclusive dos aMPV (ALEXANDER, 2007; CHU et al., 2011; CHA; YU; ZSAK, 2013).

O presente estudo teve como principal objetivo investigar a circulação dos metapneumovírus aviários em aves silvestres a partir de suabes analizados através

da técnica de RT-PCR e RRT-PCR e fazer a caracterização dos isolados visando contribuir para o conhecimento dos metapneumovírus aviários presentes no país.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CLASSIFICAÇÃO VIRAL

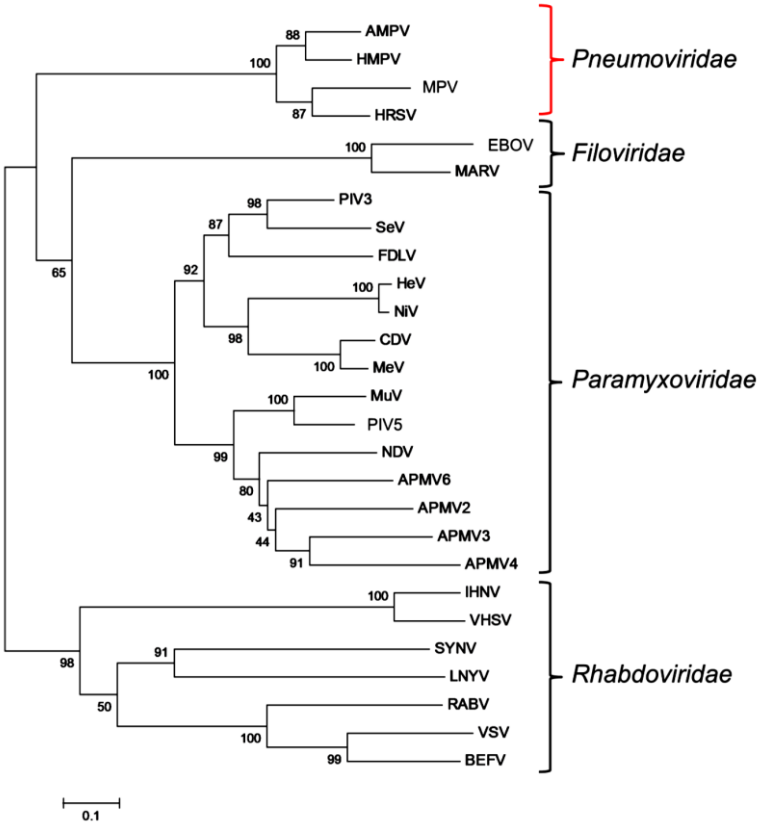
De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV), os metapneumovírus aviários (aMPV) estão inseridos na ordem dos Mononegavirales (ICTV, 2016).

Anteriormente, os aMPV eram pertencentes a família Paramyxoviridae que se subdividia nas subfamílias Paramyxovirinae e Pneumovirinae, inseridos nesta última. No entanto, em 2016, o Comitê ratificou uma série de alterações, incluindo a promoção da sub-família Pneumovirinae à família denominada Pneumoviridae levando a uma nova classificação viral. A elevação de subfamília para família foi baseada em três características: estrutura do complexo ribonucleoproteico, distância filogenética e a presença e particularidades do gene M2 (ICTV, 2016).

Análises a partir de microscopia eletrônica do nucleocapsídeo dos pneumovírus e paramixovírus e análises filogenéticas (Figura 1) usando as proteínas codificadas por pneumovírus e paramixovírus apresentaram significativas diferenças entre si, formando dois grupos bem separados que justificam a nova classificação. Além disso, apenas os membros da extinta subfamília possuem o gene M2, que codifica duas proteínas (M2-1 e M2-2), em que a proteína M2-1 é única e não possui nenhum homólogo. (ICTV, 2016).

Assim, os aMPV são atualmente pertencentes a ordem dos Mononegavirales, família Pneumoviridae, gênero *Metapneumovirus*, que aloca não só os metapneumovírus aviários como os humanos também (ICTV, 2016).

Figura 1. Árvore filogenética utilizando 200 aminoácidos da região da proteína da polimerase (L) dos Mononegavirales pelo método *Neighbour-joining* apresentando os representantes da Ordem dos Mononegavirales agrupados em diferentes *clusters* (famílias)



Fonte: ICTV, 2016

2.2 ESTRUTURA VIRAL

De forma geral, o genoma do vírus possui em média 13.560 nucleotídeos, formando oito genes que codificam nove proteínas: nucleocapsídeo (N) com 1197 nucleotídeos que codificam 391 aminoácidos (LI et al., 1996), fosfoproteína (P) com 855 nucleotídeos que codificam 278 aminoácidos (LING et al., 1995), matriz (M) com 1141 nucleotídeos e 254 aminoácidos (YU et al., 1992b), fusão (F) com 1640 nucleotídeos que codificam 538 aminoácidos (YU et al., 1991), a segunda matriz (M2) que possui duas *open reading frames* (ORF) originando os polipeptídeos M2-1 e M2-2, que possuem juntos 631 nucleotídeos que codificam 186 aminoácidos (YU et al., 1992a), hidrofóbico pequeno (SH) que possui 589 nucleotídeos que codificam 174 aminoácidos (LING; EASTON; PRINGLE, 1992), a glicoproteína (G) que possui entre 1193 e 1321 nucleotídeos e codificam 391

aminoácidos (LING; EASTON; PRINGLE, 1992; JUHASZ; EASTON, 1994); e RNA polimerase dependente de RNA (L) com 6099 nucleotídeos com 2005 aminoácidos (RANDHAWA et al., 1996) (Figura 2).

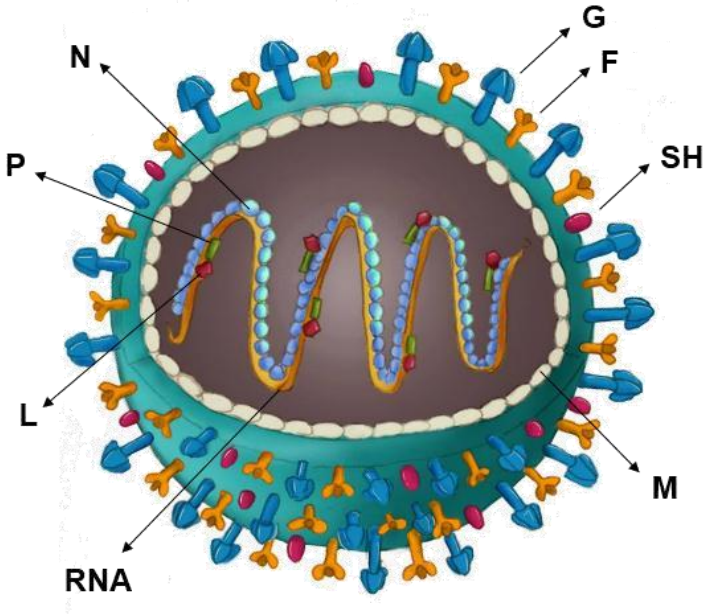
Figura 2. Genoma do Metapneumovírus Aviário (aMPV)

Fonte: Rizotto, 2017

Anteriormente, o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV), um vírus pertencente à ordem dos *Mononegavirales*, Família Rhabdoviridae (ICTV, 2016), serviu de modelo protótipo para todos os RNA negativos não-segmentados (NNS), como é o caso do aMPV. Apesar de não pertencerem à mesma família, ambos possuem mecanismos de expressão genética, modos de transcrição e replicação muito parecidos (BANERJEE; BARIK, 1992). Dessa forma, diversos estudos utilizando o VSV foram capazes de elucidar mecanismos e funções do aMPV.

A partícula viral é circundada por um envelope lipídico oriundo da membrana plasmática da célula hospedeira, no qual estão inseridas as três glicoproteínas do vírus, proteína de ligação (G), proteína de fusão (F) e as pequenas proteínas hidrofóbicas (SH) (HUANG; COLLINS; WERTZ, 1985; EASTON; DOMACHOWSKE; ROSENBERG, 2004) (Figura 3).

Figura 3. Partícula viral de um Metapneumovírus Aviário



Fonte: Rizotto, 2017

Desenho esquemático da partícula viral apresentando as glicoproteínas G (proteína de ligação), F (proteína de fusão) e SH (pequeno hidrofóbico), as outras proteínas estruturais M (proteína de matriz) e as proteínas do complexo ribonucleoproteico N (proteína de nucleocapsideo), P (fosfoproteína) e L (RNA polimerase dependente de RNA) e a fita de RNA

A proteína G, a mais variável do vírus, é uma proteína de membrana de tipo II fortemente glicosilada; responsável pela adsorção viral à superfície da célula hospedeira (EASTON; DOMACHOWSKE; ROSENBERG, 2004).

A proteína F, outra uma glicoproteína presente na superfície do envelope viral, é uma proteína de membrana de tipo I altamente antigênica, que promove a penetração do vírus à célula hospedeira e também é essencial para a fusão celular e formação de sincícios (COLLINS, P. L.; MCINTOSH; CHANOCK, 1996). Embora muitos artigos digam que a fusão ocorra em pH neutro (LAMB; PARKS, 2013), outros autores relataram que algumas cepas de hMPV e aMPV podem usar pH baixo na via endocítica (YUN et al., 2015). Yun e colaboradores (2015) observaram que resíduos de aminoácidos nas posições 100, 101 e 294 da proteína F foram determinantes na independência de pH. Dessa forma, vírus pH independentes, caso dos paramixovírus, pneumovírus e retrovírus, por exemplo, são vírus que promovem a fusão celular em uma ampla gama do pH, variando do neutro para o baixo (MARSH; HELENIUST, 1989). Ela é sintetizada inicialmente como um precursor inativo (F0), que é levado até o retículo endoplasmático e então clivado por endoproteases

hospedeiras dando origem às subunidades F1 e F2 que são funcionais (COLLINS, P. L.; MCINTOSH; CHANOCK, 1996; BROWN et al., 2014).

A proteína M, importante na montagem e saída do vírus, é uma das proteínas mais abundantes no vírion (TAKIMOTO; PORTNER, 2004), e parece interferir na apoptose da célula hospedeira, causando arredondamento das células infectadas (BARIK, 2004).

O gene M2 contém duas ORF, que codificam dois polipeptídeos denominados M2-1 e M2-2, em que a proteína M2-1 está envolvida na elongação da transcrição, atuando como um fator de processividade para a RNA polimerase além de participar da indução da resposta inflamatória do hospedeiro (EASTON; DOMACHOWSKE; ROSENBERG, 2004). A proteína M2-2 está envolvida na troca de função da RNA polimerase de transcrição para replicação do RNA viral (GOULD; EASTON, 2005).

Por ser um vírus RNA NNS, seu material genético está intimamente ligado a proteína de nucleocapsídeo (N) formando um nucleocapsídeo que confere formato helicoidal, além de resistência e proteção ao RNA viral contra RNases (BARIK, 2004). O complexo N-RNA se associa às subunidades L ou RNA-polimerase RNA-dependente (RdRP) e P, formando uma estrutura denominada complexo ribonucleoproteico. Tal complexo atua nos mecanismos de transcrição e replicação do vírus (BANERJEE; BARIK, 1992).

A síntese dos genes transcritos segue uma ordem que acompanha a ordem do genoma viral: iniciando na região *leader* que se encontra na porção 3' percorrendo gene a gene, todo o genoma (N-P-M-F-M2-SH-G-L), até encontrar a região *trailer*-5' (BANERJEE; BARIK, 1992). O sinal de parada entre os genes é uma curta sequência de uracilas (U), marcando a adição da cauda poli-A em cada mRNA nascente liberado para a tradução (EASTON; DOMACHOWSKE; ROSENBERG, 2004).

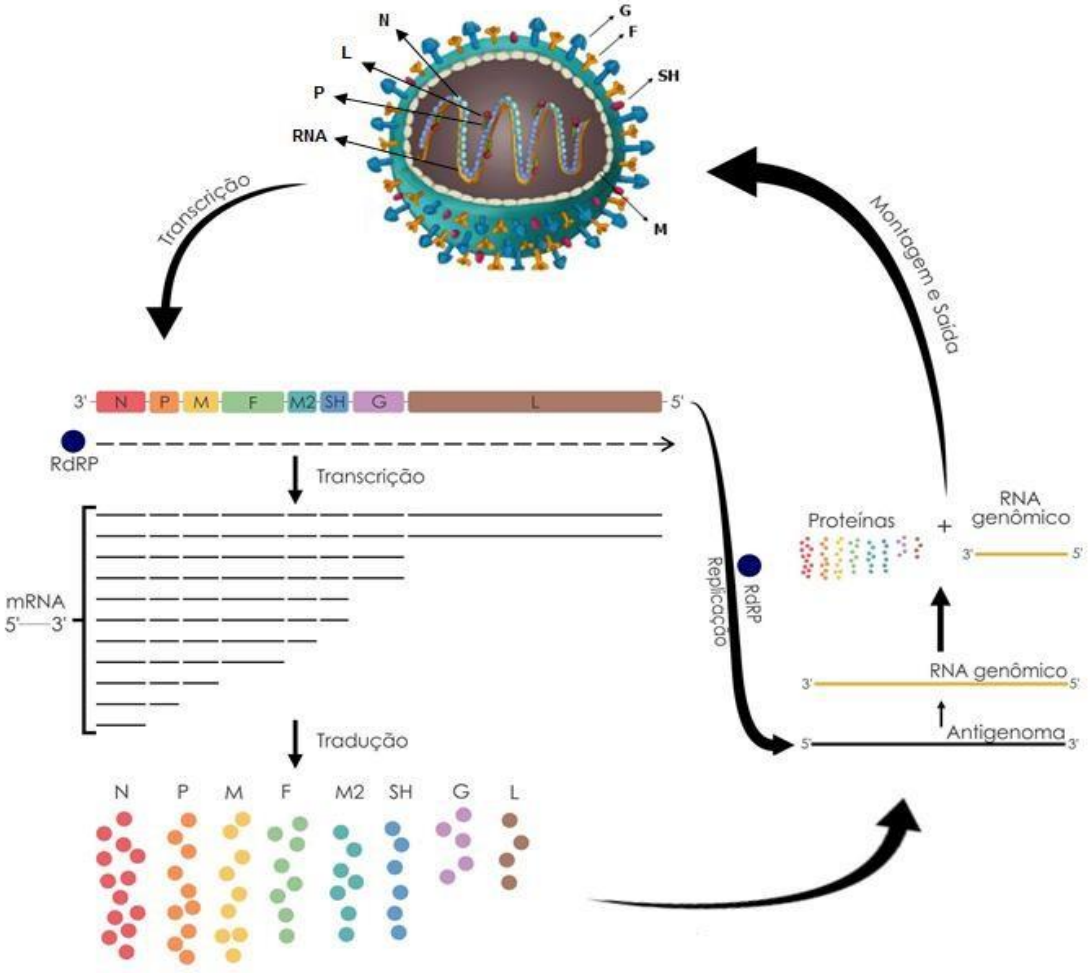
A transcrição viral, executada pela proteína L (BANERJEE; BARIK, 1992), principal componente do complexo RdRP, ocorre no citoplasma logo após a infecção (BARIK, 2004). Ela também é responsável pela síntese de todo o RNA viral, incluindo RNAs mensageiros (mRNA) intermediários replicativos e os genomas de RNA da progênie. Além dessas funções, a mesma parece ser responsável pela metilação e pelo *capping* dos mRNA (EASTON; DOMACHOWSKE; ROSENBERG, 2004).

O processo de transcrição também acompanha a polaridade da molécula, de tal modo que, genes mais próximos à região *leader* são transcritos mais vezes, apresentando mais mRNA e proteína que os genes mais distais. Isso mostra uma economia e necessidade funcionais, onde proteínas que são necessárias em abundância são transcritas mais vezes (BARIK, 2004) (Figura 4).

A proteína P funciona como um fator acessório da proteína L para a transcrição (BANERJEE; BARIK, 1992). Um estudo feito com a fosfoproteína de VSV, promoveu a deleção progressiva dos domínios da proteína e observou que a atividade de ligação N-RNA foi perdida, principalmente quando os domínios II e III foram removidos (GILL; CHATTOPADHYAY; BANERJEE, 1986). Além disso a proteína possui uma alta proporção de glutamato em sua região C-terminal, o que lhe confere uma carga muito negativa e mantem a interação das proteínas N e P e a integridade do complexo ribonucleoproteico (LING et al., 1995).

A replicação viral corresponde a síntese da fita de RNA positiva complementar à fita negativa do RNA genômico que servirá de molde para a síntese do RNA genômico viral (BANERJEE; BARIK, 1992). Apenas RNAs sentido negativo devidamente encapsidados (envolvidos pela proteína N) são empacotados nos vírions maduros (BANERJEE; BARIK, 1992). Para isso, grandes quantidades de proteína N devem estar disponíveis para que a ligação entre RNA nascente e proteína N ocorra. Especula-se que seja essa ligação que faz a mudança de transcrição para replicação (BANERJEE; BARIK, 1992), em que o RdRP ignora os sinais de parada intergênicos e gera um RNA complementar de sentido positivo completo chamado RNA antigenoma (BARIK, 2004). Assim como o genoma, o antigenoma também é encapsidado e serve como um modelo para replicação do genoma de sentido negativo (BARIK, 2004) (Figura 4).

Figura 4. Ilustração esquemática dos processos de transcrição e replicação dos Metapneumovírus



Fonte: Rizotto, 2017

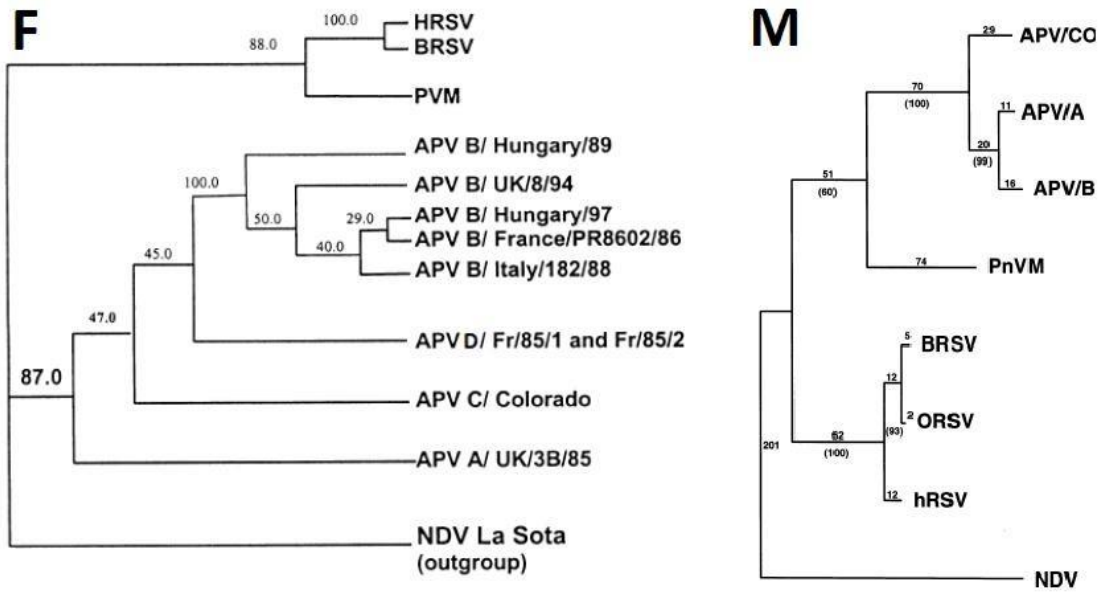
2.3 DIVERSIDADE GENÉTICA

A classificação viral é feita quanto ao padrão de neutralização antigênica das proteínas virais utilizando anticorpos monoclonais (COLLINS, M. S.; GOUGH; ALEXANDER, 1993) e pela análise filogenética a partir das sequências nucleotídicas de genes parciais, principalmente dos genes G, F, M e L (JUHASZ; EASTON, 1994; NAYLOR, C. J.; BRITTON; CAVANAGH, 1998; SEAL, 1998; BAYON-AUBOYER et al., 2000) ou do genoma completo (NAYLOR, C. J. et al., 2004; LEE et al., 2007; SUGIYAMA et al., 2010; LUPINI et al., 2011; BROWN et al., 2014).

Assim, são reconhecidos quatro subtipos denominados A, B, C e D. A análise a partir do gene da glicoproteína G, a menos conservada entre as cepas virais, tem

se mostrado uma boa ferramenta para a subtipagem dos metapneumovírus aviários há pelo menos duas décadas (JUHASZ; EASTON, 1994). A glicoproteína G tem um grau máximo de homologia de apenas 38% de aminoácidos entre os subtipos A e B (JUHASZ; EASTON, 1994; BAYON-AUBOYER et al., 2000) e é um dos principais alvos de anticorpos neutralizantes (BAYON-AUBOYER et al., 2000). No entanto, os genes F, M e N também podem ser utilizados para a classificação dos aMPV. A detecção e caracterização dos subtipos C e D, por exemplo, foram feitas a partir do perfil filogenético do gene M (SEAL, 1998) e do gene F, L e G (BAYON-AUBOYER et al., 2000), respectivamente (Figura 5).

Figura 5. Árvores filogenéticas baseadas nos genes F e M identificando os quatro metapneumovírus



Fonte: Modificado de Bayon-Auboyer et al., 2000 e Seal, 1998

Um estudo comparativo entre diferentes protocolos de RT-PCR para os genes F, G e N demonstrou que o gene do nucleocapsídeo também foi capaz de detectar todos os subtipos testados, se apresentando como uma viável ferramenta de diagnóstico (BÄYON-AUBOYER et al., 1999).

Inicialmente, no início da década de 90, a divisão dos metapneumovírus aviários em subtipos A e B, foi feita a partir de um estudo molecular utilizando enzimas de restrição, comparou os genes G de cepas isoladas no Reino Unido, África, França, Itália, Espanha e Hungria (JUHASZ; EASTON, 1994). Foi constatado

que as cepas isoladas no Reino Unido, África do Sul e França apresentavam de 99,1 a 99,9% de similaridade entre suas sequências de nucleotídeos, formando então o subtipo A, enquanto que as cepas isoladas na Espanha, Itália e Hungria formaram o subtipo B, com 99,4 a 99,7% de similaridade entre si (JUHASZ; EASTON, 1994). Entre os subtipos A e B a identidade das sequências de nucleotídeos foi de 56,3 a 57% e a sequência de aminoácidos apenas 38% (JUHASZ; EASTON, 1994). Um ano antes, Collins e colaboradores (1993) usando um painel de anticorpos monoclonais (mAbs), também observaram que os isolados britânicos eram mais relacionados entre si do que cepas isoladas na Espanha, Itália e Hungria. Anos mais tarde, os isolados franceses provaram ser na verdade subtipo B (NAYLOR, C. et al., 1997). Os autores sugerem que a divergência quanto a subtipagem seja porque as cepas analisadas por Juhasz & Easton foram cedidas pelo laboratório de Collins (NAYLOR, C. et al., 1997).

Para o aMPV de subtipo C, a análise filogenética foi realizada a partir do gene M, pois se tratava de nova cepa, com sinais clínicos compatíveis com a doença mas com ausência de reação sorológica pelos testes sorológicos da época, que até então só reconheciam os subtipos A e B (SEAL, 1998). A análise demonstrou que a cepa encontrada apresentava similaridade nas sequências de aminoácidos de 78 e 77% com os subtipos A e B, respectivamente (SEAL, 1998).

O quarto subtipo, D, surgiu a partir de um estudo retrospectivo baseado nos genes G, L e F, em que as cepas francesas isoladas em 1985, se agruparam em um clado único (Figura 5), apesar de compartilharem uma alta taxa de nucleotídeos do gene F com o subtipo B, onde estavam erroneamente inseridos até então (BAYON-AUBOYER et al., 2000). Os autores levantam a hipótese de tais isolados terem evoluído a partir de um mesmo ancestral comum ao subtipo B.

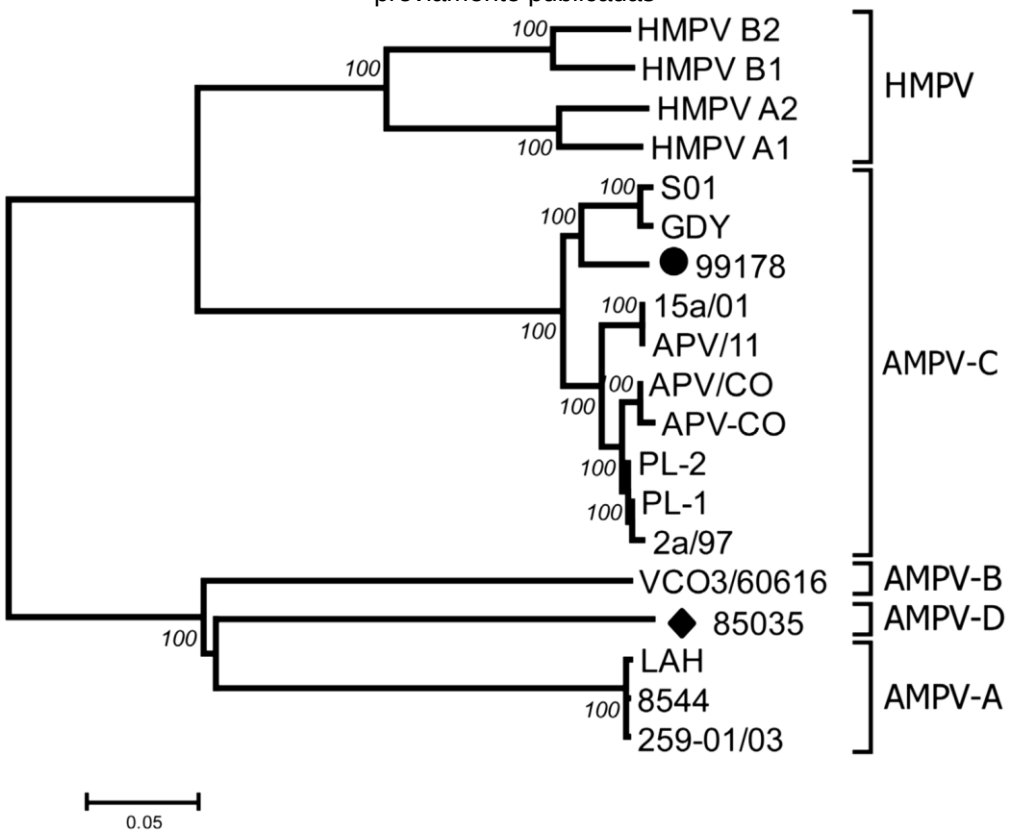
Embora essa divisão clássica já esteja bem documentada e aceita, desde o ano de 2002 (COOK, J. K.; CAVANAGH, 2002) e mais recentemente, em 2014 (BROWN et al., 2014), autores tem sugerido uma nova forma de classificação dos metapneumovírus. Já em 2005, um estudo com metapneumovírus aviários e humanos demonstrou a ampla similaridade entre as duas espécies de vírus (LWAMBA et al., 2005).

Em 2001, um isolado viral foi obtido a partir de aspirados de crianças apresentando sintomatologia respiratória característica, muito similar àquela causada pelo vírus sincicial respiratório humano (hRSV); no entanto, após análises

moleculares, o isolado apresentou uma elevada similaridade com os aMPV, além de partilharem a mesma organização genômica (VAN DEN HOOGEN et al., 2001). Isso levou a uma reclassificação das espécies virais, que passaram a fazer parte do novo gênero denominado *Metapneumovírus* (VAN DEN HOOGEN et al., 2002).

Comparações entre as sequências de aminoácidos das proteínas N, M, F, e o polipeptídeo M2-1 apresentaram mais de 80% de similaridade entre o hMPV e o aMPV subtipo C (VAN DEN HOOGEN et al., 2002). Um estudo mais recente analisou gene a gene o genoma dos metapneumovírus e encontrou resultados similares quanto às sequências de aminoácidos: as proteínas N, M, F e M2 dos hMPV e aMPV C partilhavam 90%, 88%, 81% e 85% de similaridade, entre si, respectivamente. Alta similaridade entre os subtipos A, B e D também foi observada nas mesmas proteínas supracitadas, principalmente nas proteínas N e M, que apresentaram similaridade de 90% e 94%, respectivamente (BROWN et al., 2014). Os subtipos A, B e D dos aMPV também estavam mais relacionados entre si quanto ao comprimento e identidade de aminoácidos do que com as mesmas características do aMPV C e hMPV (Figura 6). Dessa forma, os autores mostram uma maior relação gênica e conservação de nucleotídeos e aminoácidos entre o aMPV subtipos A, B e D e entre o aMPV C e hMPV sugeriendo uma nova classificação dos metapneumovírus, no qual o primeiro grupo seria formado pelos aMPV A, B e D e o segundo grupo formado pelo aMPV C e hMPV (BROWN et al., 2014).

Figura 6. Relações genéticas entre as sequências completas dos genomas de Metapneumovírus previamente publicadas



Fonte: Brown et al., 2014

2.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS AMPV

Os primeiros relatos sobre o vírus ocorreram em perus na África do Sul (BUYS; DU PREEZ, 1980), Reino Unido (MCDOUGALL; COOK, 1986) e França (GIRAUD et al., 1986). Em 1989, os mesmos sinais clínicos da enfermidade foram descritos em galinhas na África (BUYS, S. B.; DU PREEZ, J. H.; ELS, H. J., 1989). Relatos da doença e presença do vírus também ocorreram em 1988 em matrizes de corte em Israel (PERELMAN; MEROZ; SAMBERG, 1988), em galinhas no Marrocos em 1991 (EL HOUADFI et al., 1991), Taiwan em 1994 (LU et al., 1994), e em frangos de corte em diversas cidades do Japão em 1996 (TANAKA et al., 1996). Desde então o aMPV, principalmente subtipos A e B, foi descrito em aves comerciais de vários países da Europa e, mais tarde em todo o mundo.

De acordo com estudos comparativos usando mAbs (COLLINS, M. S.; GOUGH; ALEXANDER, 1993), soros policlonais (COOK, J.K.A. et al., 1993) e

análise do gene G (JUHASZ; EASTON, 1994; NAYLOR, C. et al., 1997), os primeiros isolados na África do Sul e Reino Unido pertenciam ao subtipo A e as cepas isoladas da Espanha, Itália, França e Hungria pertenciam ao subtipo B.

Em fevereiro de 1997 o primeiro isolamento de aMPV nos EUA foi descrito a partir de perus comerciais do estado do Colorado (SENNE et al., 1997). Um ano depois o isolado foi classificado como um novo subtipo, denominado C (SEAL, 1998). Mais tarde, o mesmo subtipo foi isolado em patos Muscovi na França (TOQUIN et al., 1999) e na China (SUN et al., 2014), em faisões da Coreia do Sul (LEE et al., 2007) e em galinhas na China (WEI et al., 2013).

Após análises comparativas dos genes F, G e L, duas cepas que haviam sido isoladas em 1985 na França apresentaram discrepâncias genéticas e antigênicas a ponto de não pertencerem a nenhum subtipo relatado até então, dando origem ao quarto subtipo dos aMPV (BAYON-AUBOYER et al., 2000).

A partir de 2003, vários países reportaram a co-circulação de subtipos em seus territórios. Utilizando testes de RT-PCR, a circulação dos subtipos A e B foi relatada no Japão (MASE et al., 2003), Israel (BANET-NOACH; SIMANOV; PERK, 2005), Nigéria, China, Coreia, Itália, Espanha e Hungria (OWOADE et al., 2008; CECCHINATO et al., 2010).

Estudos epidemiológicos levantam a questão quanto às barreiras sanitárias e trocas comerciais entre países. Owoade e colaboradores isolaram o vírus a partir de aves comerciais da Nigéria e de aves vivas do sudeste da China e concluiu que 21% das aves comerciais e 39% das aves vivas albergavam o vírus (OWOADE et al., 2008). Os vírus identificados em tais países possuíam alta identidade com as cepas isoladas no Brasil e Reino Unido, sugerindo uma ligação epidemiológica direta do comércio entre esses países. Segundo os autores, o risco do comércio de aves vivas na propagação ou evolução de patógenos aviários é subestimado (OWOADE et al., 2008). Corroborando com essa afirmação, no Egito, as cepas pertencentes ao subtipo A apresentavam alta similaridade com as cepas encontradas em Israel, ressaltando que as trocas comerciais que ocorrem entre os países pode ser uma fonte de transmissão viral (ABDEL-AZEEM et al., 2014).

O primeiro relato do vírus no Brasil foi feito em 1992 (ARNS; HAFEZ, 1992) e, a partir do sequenciamento do gene G, o vírus, que apresentou 99% de similaridade com o subtipo A europeu, foi classificado como pertencente a este subtipo (DANI; DURIGON; ARNS, 1999). Anos mais tarde, Chacon e colaboradores

avaliaram o gene G de cepas de aMPV circulantes no Brasil e detectaram pela primeira vez o subtipo B no território; a identidade entre os subtpipos aqui circulantes era de 98% com as estirpes europeias do subtipo B (CHACON et al., 2007).

Até o ano de 2010, ambos os subtipos A e B circulavam no Brasil apesar de uma predominância de detecção do subtipo A. A partir de 2007, o subtipo B tornou-se dominante, fato que pode ter ocorrido devido ao intenso e amplo uso de vacinas contra o subtipo A quando o vírus surgiu no país, deixando de lado a proteção contra o subtipo B (CHACON et al., 2011). Embora alguns artigos afirmem que a proteção cruzada exista (COOK, J. K. et al., 1995; TOQUIN; ETERRADOSSI; GUITTET, 1996; NAYLOR, C. et al., 1997), os autores fizeram tal afirmação baseados em estudos experimentais, e mesmo que baixos números tenham sido observados, sintomatologia clínica e detecção de RNA viral foi observada em aves que foram vacinadas e depois desafiadas com subtipo heterólogo. Estudos mais recentes, abordando situações de campo comprovam que a proteção cruzada não é completa (BANET-NOACH et al., 2009; CHACON et al., 2011).

2.5 AS AVES SILVESTRES

Paralelo às infecções em aves comerciais, está a presença do vírus também nas aves silvestres. Já em 1989, Stuart havia sugerido que a entrada do vírus no Reino Unido teria se dado através das aves migratórias (STUART, 1989).

Na verdade, as aves silvestres, principalmente aves aquáticas e migratórias, são frequentemente consideradas reservatórios ou vetores não só do metapneumovírus aviário (SHIN et al., 2001), mas de diversos patógenos aviários, como o vírus influenza e da doença de Newcastle (ALEXANDER, 1995; CHA; YU; ZSAK, 2013).

O vírus já foi detectado a partir de amostras de várias espécies de aves selvagens, incluindo estorninhos, pardais, andorinhas e gansos, patos d’asa azul e gansos selvagens (SHIN et al., 2000; BENNETT et al., 2002). No Canadá, gansos selvagens foram descritos como reservatórios naturais do vírus. Em 2004, Bennett e colaboradores também isolaram o vírus em amostras de pardais e gaivotas de Delaware (BENNETT et al., 2004). Anticorpos anti-aMPV subtipo C também foram

detectados em galeirões e corvos americanos, garças, gansos e patos selvagens (SHIN et al., 2000; SHIN et al., 2002b).

Em 2008, RNA viral e anticorpos anti-aMPV subtipo C também foram encontrados em amostras de gansos do Canadá e pombos da rocha nos estados de Georgia, Carolina do Sul, Arkansas e Ohio (EUA) (TURPIN et al., 2008).

Foi observado que os surtos de aMPV nas produções de perus dos EUA ocorriam principalmente nos meses de março a maio e de outubro a novembro, períodos de primavera e outono, que coincidem com o período de migração das aves (SHIN et al., 2000), sugerindo que as aves selvagens atuam como reservatórios e são capazes de propagar o vÍrus para áreas de produção avícola (SHIN et al., 2000; GOYAL et al., 2003; TURPIN et al., 2008).

Apesar da maioria dos relatos de aMPV subtipo C em aves silvestres serem nos EUA, o vírus também foi detectado em patos Mallard, gansos e gaivotas na Europa (VAN BOHEEMEN et al., 2012), além de anticorpos contra os subtipos A e B em avestruzes do Zimbábue (CADMAN et al., 1994). No Brasil, a circulação dos subtipos A e B em aves silvestres foi detectada em amostras de marreca-toicinho, jacupemba, periquitão-maracanã, pato-corredor, irerê e de pombo (FELIPPE et al., 2011).

2.6 SINAIS CLÍNICOS

O vírus se replica e causa infecção aguda no trato respiratório superior das aves levando a destruição do epitélio e produção de muco (JONES et al., 1988), principalmente em perus. No entanto, infecções secundárias podem fazer com que o vírus alcance o trato respiratório inferior (COOK, J. K.; ELLIS; HUGGINS, 1991) ou exacerbar os sinais clínicos da doença (JONES, 1996). Além disso, o vírus também é capaz de se replicar no oviduto ciliado das aves reduzindo a produção e a qualidade de ovos (JONES, 1996).

A doença apresenta os mesmos sinais clínicos da bordetelose causada pela bactéria *Bordetella avium* e foi muitas vezes confundida com a mesma (JONES, 1996). As perdas econômicas se devem a mortalidade, queda acentuada na

produção de ovos e aumento na taxa de condenação de carcaças (JIRJIS et al., 2002).

A morbidade pode chegar à 100% (GOYAL et al., 2000) e a severidade dos sinais clínicos são diretamente relacionados a fatores de manejo como alta densidade populacional, má condições de ventilação, umidade, higiene e biossegurança (STUART, 1989; PATTISON, 1998). A mortalidade do lote pode chegar a 80% em casos de manejo inadequado ou invasão de patógenos secundários (BUYS, S. B.; DU PREEZ, J. H.; ELS, H. J., 1989).

Em perus, única espécie sensível a todos os subtipos, o aMPV causa a rinotraqueite dos perus (MCDOUGALL; COOK, 1986), doença caracterizada por corrimento nasal, conjuntivite espumosa, espirros, edema submandibular e inchaço dos seios infraorbitais (MCDOUGALL; COOK, 1986). Agentes oportunistas também podem desenvolver infecções secundárias, agravar os sinais clínicos (RAHIMI, 2011), e aumentar as taxas de mortalidade e morbidade (COOK, J. K.; ELLIS; HUGGINS, 1991).

Nos frangos, o vírus se manifesta como a síndrome da cabeça inchada e torna-se mais grave quando associado à agentes secundários, principalmente a bactéria *Escherichia coli* (PERELMAN; MEROZ; SAMBERG, 1988). A síndrome acomete matrizes, poedeiras e frangos de corte e é caracterizada por apatia, dificuldade respiratória, opistótono, inchaço dos seios infraorbital e periorbital, além de comprometer a produção de ovos (O'BRIEN, 1985; PATTISON et al., 1989; JONES et al., 1991; HAFEZ, 1993; GOUGH et al., 1994).

2.7 DIAGNÓSTICO

Por ser um vírus de difícil isolamento, testes sorológicos foram por muitos anos o método de eleição para o diagnóstico de infecções por aMPV em lotes comerciais (OIE, 2009), principalmente o ELISA, por ser um teste rápido e econômico (ETERRADOSSI et al., 1992). Imunofluorescência e vírus neutralização usando anticorpos monoclonais também foram amplamente utilizados (OIE, 2009).

Há algum tempo o diagnóstico tem focado em testes moleculares, principalmente a RT-PCR e RRT-PCR, por permitirem uma detecção rápida e sensível

(DANI; DURIGON; ARNS, 1999; BAYON-AUBOYER et al., 2000; COOK, J. K.; CAVANAGH, 2002). A especificidade do teste é ditada pelos *primers* utilizados. Testes com alvo na proteína de fixação (G), no pequeno hidrofóbico (SH) ou direcionados para o gene N ou M são capazes de detectar o vírus a partir de RT-PCR (SEAL, 1998; GUIONIE et al., 2007).

A detecção também pode ser feita através do isolamento e cultivo do vírus em culturas de tecido traqueal (TOC) de galinhas ou perus, em ovos embrionados de galinha ou peru (COOK, J. K. A. et al., 1999) ou alternativamente, em culturas celulares (GIRAUD et al., 1986; D'ARCE et al., 2005). Em TOC é observado ciliostase, com exceção do subtipo C, depois de seis dias, necessitando de pelo menos quatro passagens com intervalo de três a quatro dias (COOK, J. K., 2000). Em ovos embrionados pode ser observado hemorragias e até a morte do embrião após três passagens. Nas células, o efeito citopático é caracterizado por arredondamento celular e formação de sincícios (BUYS, S.B.; DU PREEZ, J.H.; ELS, H.J., 1989). O cultivo celular pode ser feito em fibroblastos de embrião de galinha (CEF) (GRANT; BAXTER-JONES; WILDING, 1987) ou células de rim de macaco verde (VERO) (BUYS, S.B.; DU PREEZ, J.H.; ELS, H.J., 1989).

Apesar de ser recente, cara, e pouco convencional, a metagenômica parece ser promissora na detecção de uma ampla gama de agentes infecciosos, melhorando significativamente o diagnóstico e controle de doenças (BELAK et al., 2013). Permitindo detectar agentes isolados, co-infecções e até mesmo doenças multifatoriais, contribuindo com estudos de patogenicidade e o desvendando o papel desses agentes infecciosos novos ou já conhecidos (BELAK et al., 2013). A técnica também pode ser usada na descoberta de novos vírus e na reconstrução de genomas completos (CAPOBIANCHI; GIOMBINI; ROZERA, 2013). No entanto, alguns autores relataram que a amplificação aleatória pode ser inconveniente, já que resulta na amplificação de todos os ácidos nucleicos, incluindo os ácidos nucleicos do hospedeiro (PRACHAYANGPRECHA et al., 2014).

2.8 CONTROLE

O controle da enfermidade está diretamente ligado a boas práticas de gestão e de biosseguridade rigorosa, e o principal método de controle se dá por meio de vacinação (COOK, J. K., 2000).

No mercado, estão disponíveis vacinas vivas atenuadas que são obtidas a partir de constantes passagens do vírus em ovos embrionados ou culturas celulares e as vacinas inativadas, que fornecem uma imunidade de curto prazo. Vacinas vivas atenuadas podem ser usadas em aves jovens, perus em crescimento, frangos de corte e em matrizes de perus, enquanto que as vacinas inativadas podem ser administradas em galinhas reprodutoras e de postura (antes da postura) ou em aves já vacinadas, com o objetivo de produzirem níveis elevados e uniformes de anticorpos (OIE, 2009; CHA; YU; ZSAK, 2013).

Quando corretamente administrada, a vacinação promove boa proteção e reduz significativamente a prevalência de infecção. A via de administração pode ser na água de beber, pulverização ou administração oculonasal e intramuscular (OIE, 2009; CHA; YU; ZSAK, 2013).

Em 2009, um estudo avaliou a ocorrência de infecção por aMPV em aves e o impacto do programa de vacinação contra aMPV. De acordo com testes de RT-PCR, todos os lotes de galinhas apresentaram resultado negativo, ao contrário dos lotes de perus, que apresentam resultados positivos em pelo menos uma fase do estudo, tanto em lotes vacinados quanto em lotes não vacinados (BANET-NOACH et al., 2009). A comparação entre as sequências das amostras e as cepas vacinais mostrou que os isolados do subtipo A eram de origem vacinal e também de campo. Já os isolados pertencentes ao subtipo B eram todos de origem de campo. A identidade deduzida das cepas aMPV demonstrou que todos os lotes independentemente de vacinados ou não foram infectados com cepas de campo de aMPV após a vacinação, mostrando a ineficiência da vacina para proteger os lotes (BANET-NOACH et al., 2009).

Estudos epidemiológicos moleculares sobre os subtipos encontrados no Brasil são necessários para estimar a prevalência dos mesmos e evitar a inclusão de estirpes heterólogas por vacinação (D'ARCE et al., 2005) ou a possibilidade de

escape vacinal para o meio ambiente e infecção de aves que não são alvo na vacinação.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Contribuir para a sanidade de plantéis avícolas comerciais pela identificação de metapneumovírus aviários em aves silvestres com potencial repercussão sanitária.

3.2 ESPECÍFICOS

a) Investigar a presença dos metapneumovírus aviários pertencentes ao gênero *Metapneumovírus* da família Pneumoviridae em amostras de aves silvestres e sinantrópicas;

b) Analisar filogeneticamente as amostras identificadas buscando avaliar as relações filogenéticas com estirpes circulantes na natureza e/ou em criações comerciais;

c) Depositar as informações geradas em bancos de dados e constituir um banco de amostras de vírus circulantes que possam contribuir para o entendimento da epidemiologia destas infecções e para a sua profilaxia em criações comerciais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

4.1.1 Suabes

Dos 448 suabes usados neste estudo, 192 já haviam sido coletados em projetos anteriores sendo 40 deles oriundos do Parque Ecológico Municipal de Americana "Eng. Cid Almeida Franco", Americana, SP e 152 provenientes da Casa das Aves, comércio de insumos e aves exóticas, Pirassununga, SP. Outros 68 suabes foram coletados no ano de 2015 na Mata Ciliar de Jundiaí, Jundiaí, SP (Tabela 1). Todos os suabes foram coletados em conformidade com as diretrizes de proteção animal e aprovação legal do ICMBio (SISBIO nº3475-1) e do Comitê de Ética e Uso de Animais USP (CEUA-FZEA-USP nº 2012.1.170.74.0, CEUA-FMVZ 5201050214 e CEUA-FMVZ-USP nº 2309251114).

Além desses, 188 suabes foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Edison L. Durigon do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB-II), da Universidade de São Paulo e foram coletados no Clube de Campo São Paulo, São Paulo, SP (Tabela 1).

No total, foram testadas amostras de 27 espécies diferentes pertencentes a sete ordens: 169 Anseriformes, 28 Psittaciformes, 18 Strigiformes, oito Columbiformes, oito Piciformes, dois Falconiformes e um Cariamiforme (Tabela 1).

Dos 448 suabes, 128 (28,58%) deles foram processados de maneira individual e 132 (29,46%) na forma de *pools* de até cinco animais que estavam no mesmo recinto e respeitando o mesmo tipo de suabe (orofaringeano ou cloacal) (SPACKMAN et al., 2013) resultando em 34 amostras (dezessete orofaringeanos e dezessete cloacais). Os 188 suabes restantes (41,96%) foram agrupados na forma de *pools* de até dois animais, contendo o suabe orofaringeano e cloacal de cada animal (DE ARAUJO et al., 2014), formando então 48 amostras. Desse modo, 128 suabes foram processados e testados de maneira individual e 320 suabes foram

agrupados em 82 *pools*, no qual cada *pool* foi considerado como uma amostra, formando então um conjunto amostral de 210 amostras.

Foram utilizadas 124 amostras de suabe oriundas de 184 aves correspondentes a dezessete espécies diferentes para o teste de RT-PCR convencional (RT-PCR) baseado no gene N e 184 amostras pertencentes a 184 aves de 24 espécies diferentes pelo teste de RT-PCR em tempo real (RRT-PCR) baseado no gene G (Tabela 1).

Tabela 1. Relação de amostras testadas quanto a espécie, número de aves, quantidade e tipo de suabe e origem

Espécie	Nº de Aves	Total de Suabe	Suabe OP	Suabe Cloacal	Nª Aves Testadas por RRT-PCR gene G	Nª Aves Testadas por RT-PCR gene N	Local de Coleta
Anas platyrhynchos domestica	6	12	6	6	6	6	Casa das Aves
Aix galericulata	61	122	61	61	61	59	Casa das Aves, Parque Ecológico Municipal de Americana
Aix sponsa	8	15	8	7	8	8	Casa das Aves, Parque Ecológico Municipal de Americana
Cereopsis novaehollandiae	2	4	2	2	2	1	Parque Ecológico Municipal de Americana
Cygnus melanocoryphus	1	2	1	1	1	1	Parque Ecológico Municipal de Americana
Cygnus atratus	1	1	1	0	1	1	Parque Ecológico Municipal de Americana
Chenonetta jubata	4	8	4	4	4	4	Casa das Aves
Dendrocygna viduata	73	146	73	73	38	73	Clube de Campo São Paulo
Dendrocygna autumnalis	10	20	10	10	0	10	Clube de Campo São Paulo
Dendrocygna bicolor	1	2	1	1	0	1	Clube de Campo São Paulo
Cairina moschata	2	4	2	2	0	2	Clube de Campo São Paulo
Cariama cristata	1	2	1	1	1	0	Associação Mata Ciliar
Columba livia	8	16	8	8	6	8	Clube de Campo São Paulo
Falco sparverius	2	4	2	2	2	1	Associação Mata Ciliar
Ramphastos dicolorus	2	4	2	2	2	1	Associação Mata Ciliar
Ramphastos toco	3	6	3	3	3	0	Associação Mata Ciliar
Dryocopus lineatus	2	2	2	0	2	0	Parque Ecológico Municipal de Americana
Colaptes melanochloros	1	1	1	0	1	0	Parque Ecológico Municipal de Americana
Amazona aestiva	1	2	1	1	1	1	Associação Mata Ciliar
Amazona farinosa	1	1	1	0	1	0	Parque Ecológico Municipal de Americana
Aratinga leucophthalma	23	35	23	12	23	6	Parque Ecológico Municipal de Americana, Associação Mata Ciliar
Alipiopsitta xanthops	1	1	1	0	1	0	Parque Ecológico Municipal de Americana
Ara chloropterus	2	2	2	0	2	0	Parque Ecológico Municipal de Americana
Megascops choliba	13	26	13	13	13	1	Associação Mata Ciliar
Asio clamator	1	2	1	1	1	0	Associação Mata Ciliar
Tyto alba	1	2	1	1	1	0	Associação Mata Ciliar
Athene cunicularia	3	6	3	3	3	0	Associação Mata Ciliar
Total	**234**	**448**	**234**	**214**	**184**	**184**	

4.1.2 Amostras de *Egretta thula* após um surto

Em abril de 2016, também foram coletadas amostras de garça branca (*Egretta thula*) no Parque Ecológico Municipal de Americana. Foi relatado mortalidade tanto das garças, quanto de papagaios (*Amazona aestiva*), que tinham seu recinto abaixo de uma árvore em que a população de garças se instalou durante o período de reprodução.

Três aves da espécie *Egretta thula* que haviam caído de seu ninhal foram enviadas ao Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva Aplicada - USP, Pirassununga, SP, das quais foram coletados suabes orofaringeano e cloacal de cada ave, além de amostras de tecido traqueal e pulmonar.

Os suabes foram processados e testados na forma de *pools*, respeitando o tipo de suabe, formando uma amostra contendo os suabes orofaringeanos e cloacais de cada ave. As amostras de tecido também foram agrupadas em *pools*, respeitando o tipo de tecido, formando assim uma amostra contendo amostras de traqueia e outra amostra contendo amostras de pulmão de cada ave.

Tais amostras também foram utilizadas para os testes de RT-PCR baseado no gene N e RRT-PCR baseado no gene G.

4.2 AMOSTRAS PADRÃO

Foram utilizadas como controle positivo para a padronização das técnicas de RT-PCR e RRT-PCR as vacinas comerciais Poulvac® TRT (Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda) e Nemovac® (Merial Saúde Animal Ltda) para aMPV A e aMPV B, respectivamente.

Como controle de especificidade, a vacina comercial New-Vacin La Sota contendo o vírus da doença de Newcastle (NDV) (Laboratório Biovet S/A) e a vacina Bio-Bronk-Vet (Laboratório Biovet S/A) do vírus da bronquite infecciosa (IBV), foram utilizadas.

4.3 PURIFICAÇÃO DO RNA VIRAL

A purificação do RNA viral foi realizada a partir de suabes individuais e/ou amostras de tecido agrupadas em *pools* conforme descrito anteriormente. Os RNAs virais dos suabes coletados foram extraídos com o *kit* QIAamp® RNA Mini (Qiagen) conforme as instruções do fabricante.

4.4 REAÇÃO DE RT-PCR CONVENCIONAL BASEADA NO GENE N

A detecção dos aMPV foi realizada por uma RT-PCR baseada no gene N utilizando o *kit* QIAGEN® OneStep RT-PCR (Qiagen) e oligonucleotídeos descritos anteriormente por BÄYON-AUBOYER et al. (1999) (Tabela 2), com concentrações finais de 400µM de cada dNTP, 0,6µM de cada oligo, 1x de *buffer* 5x QIAGEN OneStep RT-PCR com 2,5mM de $MgCl_2$, 1µL de QIAGEN OneStep RT-PCR *Enzyme Mix*, 2,5µL de RNA extraído da amostra e água ultra pura para volume de 25µL.

Os ciclos foram realizados no termociclador C1000 Touch (Bio-Rad) seguindo as indicações do fabricante do kit e a temperatura de anelamento descrita pelos autores de referência dos oligonucleotídeos: 30 minutos a 50°C para transcrição reversa, 15 minutos a 95°C para ativação da enzima taq polimerase e desativação da enzima transcriptase reversa. Após, foram efetuados 40 ciclos de PCR: 30 segundos a 94°C para denaturação, 1 minuto a 51°C para anelamento e 72°C por 1 minuto para extensão. Ao final dos ciclos de PCR, foi realizada uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

4.5 VALIDAÇÃO DO TESTE DE RT-PCR EM TEMPO REAL (RRT-PCR)

Após a extração do RNA viral das vacinas com o kit *QIAmp RNA Mini Kit* (Qiagen), diluições seriadas na base 10 até a décima diluição do RNA viral de aMPV A e aMPV B foram realizadas utilizando respectivamente, as vacinas Poulvac TRT (Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda) e Nemovac (Merial Saúde Animal Ltda) para determinar a eficiência, linha de corte (*threshold*) e limite de detecção dos testes. A eficiência para os testes moleculares apresentou valores entre 90 a 110% e os valores da linha de corte e limite de detecção foram estabelecidos.

As concentrações foram quantificadas no espectrofotômetro DeNovix DS-11 (DeNovix Inc.).

O valor do ponto de corte (PC) dos testes foi calculado de acordo com a equação:

$$PC = \text{último concentração detectável} + 3x \text{ desvio padrão}$$

4.6 REAÇÃO DE RRT-PCR BASEADA NO GENE G

A reação de RRT-PCR baseada no gene G específica para os subtipos A ou B foi realizada com o kit *TaqMan® Fast Virus 1 Step Master Mix* (Life Technologies) com concentrações finais de 1x do 4X Master Mix *TaqMan® Fast Virus 1-Step*, 0,5µM de cada *primer*, 0,25µM de sonda, 2µL de RNA extraído da amostra e água ultra pura para volume final de 20µL.

A reação foi realizada seguindo os ciclos: 5 minutos à 50°C para a transcrição reversa, seguido de 20 segundos a 95°C para a inativação da enzima RT e ativação da enzima Taq polimerase. Após esta etapa, foram efetuados 50 ciclos de 15 segundos a 95°C para a denaturação e 1 minuto a 60°C para anelamento e detecção da fluorescência. As reações foram realizadas no termociclador Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche).

As reações de RRT-PCR para a detecção do gene G dos aMPV subtipo A ou B, foram baseadas em sondas marcadas com fluorescência FAM; as sequências dos oligonucleotídeos e sondas foram baseadas em estudos anteriores (GUIONIE et al., 2007) e estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos oligonucleotídeos e sondas utilizados com seus respectivos genes alvo

Vírus	Gene Alvo	Nome	Sequência *Primer*/Sonda	Tamanho Esperado do Amplicon	Referência
aMPV A	G	*Primer* A Fw Sonda A *Primer* A Rev	5'-GGACATCGGGAGGAGGTACA-3' 5'-FAM-CACTCCTCTAACACTGACTGTTCAACT-BHQ-3' 5'-CACTCCTCTAACACTGACTGTTCAACT-3'	116bp	Guionie et al., 2007
aMPV B	G	Primer B Fw Sonda B *Primer* B Rev	5'-AATAGTCCTCAAGCAAGTCCTCAGA-3' 5'-FAM-CTGGTGTTATCAGCCTTAGGCTTGACGCT-BHQ-3' 5'-CTGTCGTAATTTGACCTGTTCTACACT-3'	135bp	Guionie et al., 2007
aMPV	N	*Primer* Nd Fw *Primer* Nx Rev	5'-AGCAGGATGGAGAGCCTCTTTG-3' 5'-CATGGCCCAACATTATGTT-3'	115bp	Bayon-Auboyer et al., 1999

4.7 ISOLAMENTO VIRAL

As amostras positivas que ainda possuíam material foram inoculadas pela via alantoide em ovos de galinhas livres de patogenos específicos (SPF) com nove dias de incubação para enriquecimento e isolamento viral. Para isso, foram inoculados 100µL da amostra pela via alantoide e os ovos foram monitorados diariamente durante sete dias. Ao final dos sete dias ou com a identificação de mortalidade, o líquido foi coletado e estocado à -80°C.

Das quatorze amostras positivas, nove foram inoculadas sendo elas: quatro de pato mandarim (*Aix galericulata*) (duas amostras orofaringeanas e duas cloacais), uma de Irerê (*Dendrocygna viduata*) (amostras traqueais e cloacais), uma de pato carolino (*Aix sponsa*) (amostra orofaringeana), uma de falcão americano (*Falco sparverius)* (amostra cloacal), uma de pombo (*Columba livea*) (amostras traqueais e cloacais) e uma de garça branca (*Egretta thula*) (amostra de tecido traqueal) (Tabela 3).

Tabela 3. Amostras positivas inoculadas em ovos embrionados de galinha

Cód. da Amostra	Espécie	Passagem
A02T	*Aix sponsa*	5p
CA07C	*Aix galericulata*	2p
CA08T	*Aix galericulata*	1p
CA12T	*Aix galericulata*	1p
P64C	*Aix galericulata*	2p
AMC28C	*Falco sparverius*	2p
P.ICB 26	*Dendrocygna viduata*	1p
P.ICB 47	*Columba livia*	1p
Pool traqueia	*Egretta thula*	3p

4.8 SEQUENCIAMENTO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Para confirmação dos resultados positivos, sequenciamento Sanger foi realizado. Para tanto, foram utilizados dois kits comerciais: o *SuperScript® III One-Step RT-PCR* (Invitrogen) para a reação de RT-PCR e o *Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) para realização de uma segunda PCR, com o objetivo de aumentar a concentração do amplicon.

A primeira reação, utilizando o kit *SuperScript® III One-Step RT-PCR* (Invitrogen), com concentrações finais de 1x de 2X *Reaction Mix* contendo 200µM de cada dNTP, 0,4µM de RNAse OUT, 0,5µM de cada oligonucleotídeo, 2mM de $MgSO_4$, 1µL da enzima SuperScript™III RT, 5µL de RNA extraído da amostra e água ultra pura para volume final de 25µL.

A segunda reação, utilizando o kit *Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) respeitando as seguintes concentrações finais de cada reagente: 1x do *Buffer 10X PCR*, -Mg, 2mM de $MgCl_2$, 0,6µM de cada *primer*, 0,5mM de dNTP, 2,5U de Platinum™ Taq DNA *Polymerase*, 4µL de RNA extraído da amostra e água ultra pura para volume final de 50µL.

Ambas as reações foram realizadas utilizando os mesmos oligonucleotídeos usados no teste baseado no gene N para detecção dos aMPV.

Quanto aos ciclos, as reações foram realizadas obedecendo as indicações do fabricante dos kits no termociclador C1000 Touch (Bio-Rad). Os produtos da PCR foram visualizados pela luz ultravioleta (UV) após a eletroforese em gel

agarose a 2.0% contendo o corante SYBR *safe* (Life Technologies) em tampão tris-borato (pH 8.0) com marcador de peso molecular de 100bp (Amresco).

As reações de sequenciamento foram realizadas em duplicata, os fragmentos de PCR foram purificados utilizando o kit illustra™ GFX™ PCR DNA *and Gel Band Purification* (GE Healthcare) e então enviadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (CEGH-CEL), Setor de Sequenciamento de DNA conforme recomendações do centro. O sequenciamento foi realizado utilizando o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) no equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems).

4.9 ANÁLISES DE DADOS E FILOGENÉTICA

As sequências obtidas foram primeiramente avaliadas quanto a sua qualidade através do programa Sequence Scanner™ Software 2 (Applied Biosystems) e depois alinhadas pelo programa Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) no programa Bioedit Sequence Alignment versão 7.2.5. (HALL, 1999), juntamente com sequências do gene N de aMPV depositadas no GenBank para comparação da similaridade. Após, as sequências foram editadas pelo programa MEGA versão 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016)

Análises e árvores filogenéticas foram realizadas também pelo programa MEGA versão 7.0, e deduzidas utilizando o método *Maximum Likelihood* com *bootstrap* de 1000 réplicas.

5 RESULTADOS

5.1 REAÇÃO DE RT-PCR CONVENCIONAL BASEADA NO GENE N

Foram testadas 124 amostras de suabe oriundas de 187 aves de dezoito espécies diferentes pertencentes à ordem dos Anseriformes (83,87%), Psittaciformes (8,06%), Columbiformes (3,22%), Pelecaniformes (1,61%), Falconiformes (1,61%), Strigiformes (0,806%) e Piciformes (0,806%), pelo teste de RT-PCR baseado no gene N.

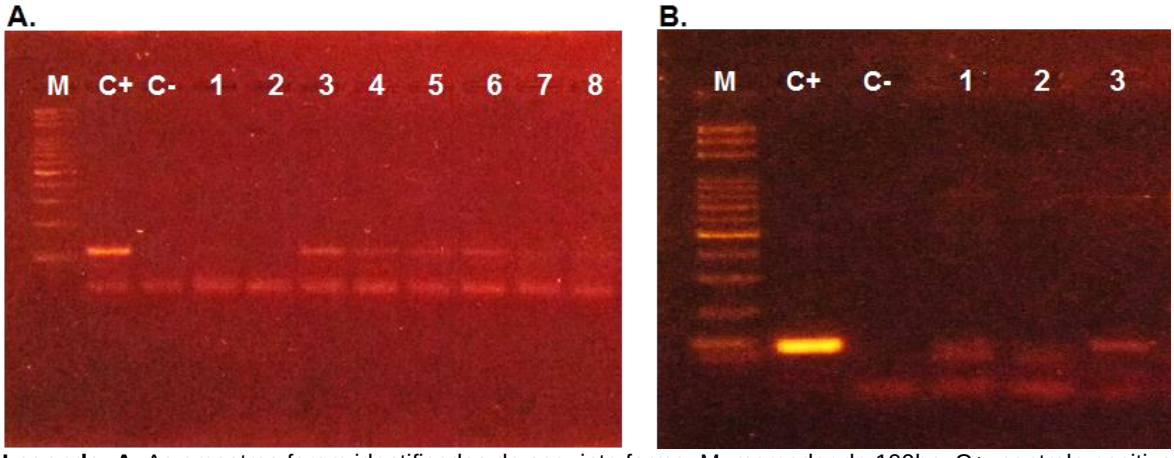
O teste foi capaz de detectar quatorze amostras positivas (11,1%) (Tabela 4 e Figura 7), sendo: oito amostras de Anseriformes (*Aix sponsa, Aix galericulata, Dendrocygna viduata*), três de Columbiformes (*Columba livia*), um de Falconiforme (*Falco sparverius*), um de Psittaciforme (*Aratinga leucophtalma)* e um de Pelecaniforme (*Egretta thula*). Das amostras de suabe, cinco eram provenientes de suabes orofaringeanos, e quatro de suabes cloacais, as outras quatro amostras foram detectadas nas amostras processadas em *pools* de até dois animais, que continham os suabes orofaringeanos e cloacais de cada ave.

Das quatro amostras testadas de *Egretta thula* coletadas no Parque Ecológico Municipal de Americana "Eng. Cid Almeida Franco", Americana, SP, apenas o *pool* de traqueia foi positivo pelo teste de RT-PCR baseada no gene N.

Tabela 4. Amostras positivas por RT-PCR baseada no gene N para aMPV

Cód. da Amostra	Nº de Suabes	Nº de Amostras	Espécie
A2-T	1	1	*Aix sponsa*
A8-T	1	1	*Aratinga leucophtalma*
AMC 28C	1	1	*Falco sparverius*
P64C	1	1	*Aix galericulata*
P12C (CA07C)	1		*Aix galericulata*
P13C (CA07C)	1		*Aix galericulata*
P14C (CA07C)	1	1	*Aix galericulata*
P17C (CA07C)	1		*Aix galericulata*
P18C (CA07C)	1		*Aix galericulata*
P19T (CA08T)			*Aix galericulata*
P22T (CA08T)			*Aix galericulata*
P23T (CA08T)	1	1	*Aix galericulata*
P24T (CA08T)			*Aix galericulata*
P27T (CA08T)			*Aix galericulata*
P44T (CA12T)	1		*Aix galericulata*
P153T (CA12T)	1	1	*Aix galericulata*
P152T (CA12T)	1		*Aix galericulata*
P157C (CA14C)	1		*Aix galericulata*
P164C (CA14C)	1		*Aix galericulata*
P169C (CA14C)	1	1	*Aix galericulata*
P167C (CA14C)	1		*Aix galericulata*
P173C (CA14C)	1		*Aix galericulata*
P177T (CA17T)	1	1	*Aix galericulata*
ICB-DPV 55 (P. ICB 26)	2	1	*Columba livia*
ICB-DPV 56 (P. ICB 26)	2		*Columba livia*
ICB-DPV 89 (P. ICB 46)	2	1	*Columba livia*
ICB-DPV 90 (P. ICB 46)	2		*Columba livia*
ICB-DPV 91 (P. ICB 47)	2	1	*Columba livia*
ICB-DPV 92 (P. ICB 47)	2		*Columba livia*
ICB-DPV 93 (P. ICB 48)	2	1	*Columba livia*
ICB-DPV 94 (P. ICB 48)	2		*Columba livia*
A46 Traqueia (*pool* traqueia)	1		*Egretta thula*
A47 Traqueia (*pool* traqueia)	1	1	*Egretta thula*
A48 Traqueia (*pool* traqueia)	1		*Egretta thula*
TOTAL	42	14	

Figura 7. Detecção de amostras positivas para obtenção de fragmentos com tamanho de 115pb pelo teste RT-PCR baseado no gene N e visualizadas em gel de agarose a 2%



Legenda: A. As amostras foram identificadas da seguinte forma: M: marcador de 100bp; C+: controle positivo com tamanho esperado de 115 bp; C-: controle negativo; 1 a 8: amostras testadas pelo teste de RT-PCR; amostras 1 (CA08T), 2 (A02T), 3 (P64C), 4 (AMC28C), 5 (P. ICB26), 6 (CA07C), 7 (CA12T) e 8 (P. ICB47), as amostras de 3 a 8 foram positivas. **B.** As amostras foram identificadas da seguinte forma: M: marcador de 100bp; C+: controle positivo com tamanho esperado de 115 bp; C-: controle negativo; 1 a 3: amostras testadas pelo teste de RT-PCR; 1 (AP03C), 2 (AP03T), 3 (*pool* traqueia), a amostra 3 foi positiva.

5.2 VALIDAÇÃO DO TESTE DE RRT-PCR

As amostras padrões de aMPV A e aMPV B apresentaram as concentrações iniciais de 1,04 x10^7 fg/µL e 1,74 x10^7 fg/µL, respectivamente.

A curva padrão para a detecção do aMPV A foi obtida utilizando o RNA viral extraído da vacina Poulvac® TRT (Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda) e gerada utilizando quatro pontos representados pelas diluições 10^{-1},10^{-3}, 10^{-5} e 10^{-6} e os *primer*s e reação descritos abaixo. Dessa forma, a eficiência da reação foi de 2,008 e *slope* de -3,303. O ponto de corte (*threshold*) para o teste de aMPV A foi de 38,37 e o limite de detecção deste teste foi de 0,10448 fg/µL (diluição de 10^{-9}).

A curva padrão do RRT-PCR para a detecção do aMPV B, também foi construída utilizando quatro pontos, sendo eles 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} e 10^{-7}, atingindo a eficiência de 2,020 e *slope* de -3,276. O ponto de corte do teste para aMPV B ficou em 37,97 e o limite de detecção 17,449 fg/µL (diluição de 10^{-7}).

Conforme esperado, a especificidade dos testes usados foi observada na detecção de aMPV A e aMPV B quanto ao subtipo e não detectaram os vírus NDV e IBV.

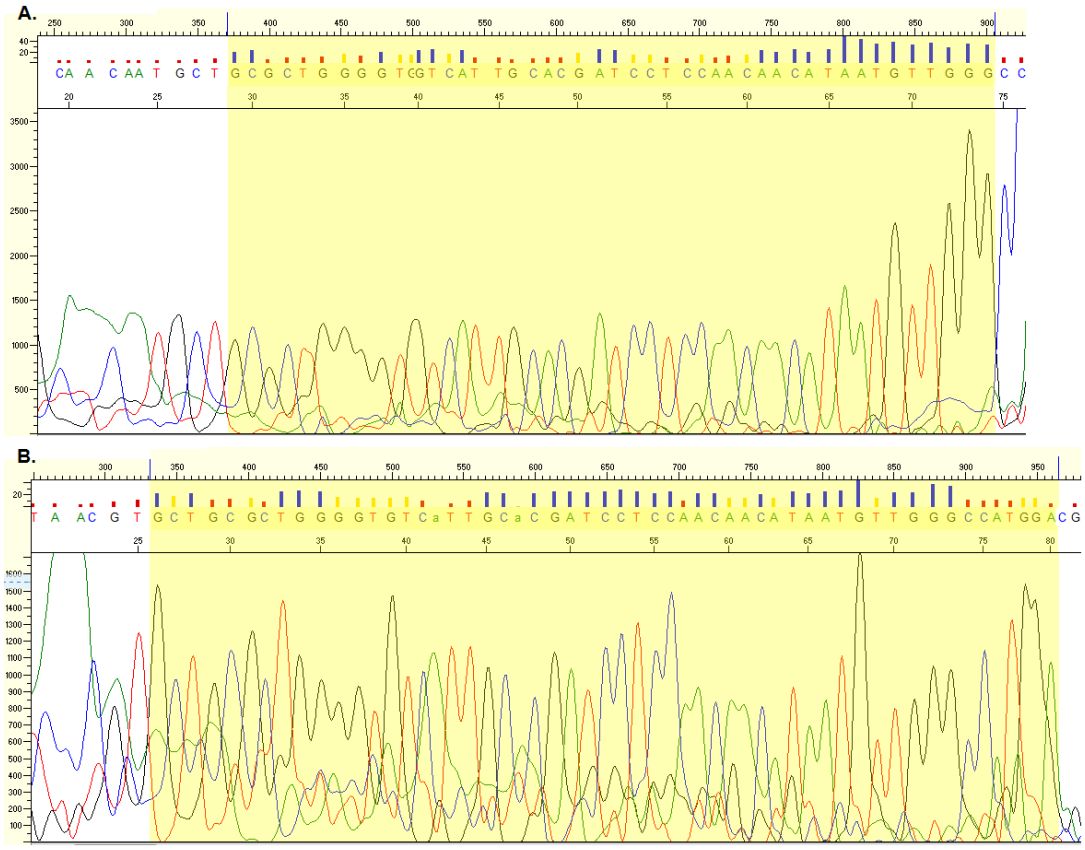
5.3 REAÇÃO DE RRT-PCR BASEADA NO GENE G

Pelo teste de RRT-PCR baseado no gene G não foi detectada nenhuma das 184 amostras testadas provenientes de 184 aves pertencentes a 24 espécies diferentes que fazem parte da ordem dos Anseriformes, Psitaciformes, Strigiformes, Piciformes, Columbiformes, Falconiformes e Cariamiformes.

5.4 SEQUENCIAMENTO, ANÁLISE DE DADOS E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Foram feitas várias tentativas para confirmação e caracterização das amostras detectadas pelo teste de RT-PCR baseado no gene N, e foi obtido relativo sucesso em duas amostras, a amostra de suabe cloacal de *Aix galericulata* e a amostra de tecido de traqueia de *Egretta thula*. Com fragmentos de 44 e 54 nucleotídeos, respectivamente (Figura 8).

Figura 8. Cromatograma dos fragmentos obtidos e avaliados pelo programa SeqScanner Software



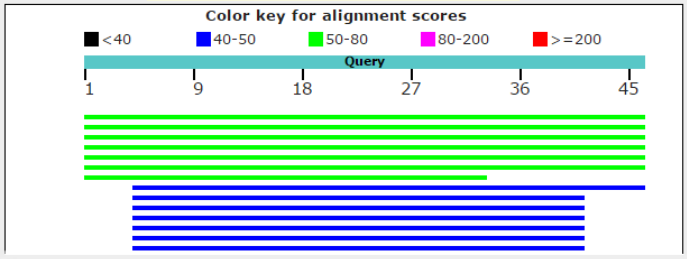
Legenda: **A.** Cromatograma do fragmento de 44 nucleotídeos obtido a partir da amostra de *Aix galericulata* utilizado para análises filogenéticas**. B.** Cromatograma do fragmento de 54 nucleotídeos obtido a partir da amostra de *Egretta thula* utilizado para análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas com base em 23 sequências do genoma parcial do aMPV contendo o gene N e nove sequências do genoma completo disponíveis do Genbank.

Apesar do pequeno fragmento do gene N utilizado para as análises – 44 nucleotídeos para a amostra de *Aix galericulata* e 54 nucleotídeos para a amostra de *Egretta thula* – de acordo com o BLAST, ambas as amostras apresentaram maior identidade com cepas pertencentes ao aMPV subtipo A (números de acesso JF424833.1, GU383068.1, DQ666911.1, principalmente) (Figura 9).

Figura 9. BLAST dos fragmentos das amostras sequenciadas apresentando sequências semelhantes

A.



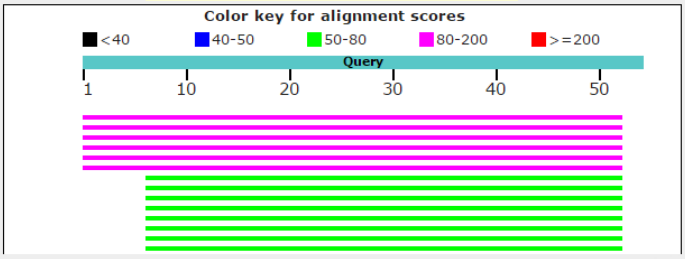
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Avian metapneumovirus isolate IT/Ty/A/259-01/03, complete genome	71.6	71.6	100%	5e-10	96%	JF424833.1
Avian metapneumovirus vaccine strain A nucleocapsid (N) gene, partial cds	71.6	71.6	100%	5e-10	96%	GU383068.1
Avian metapneumovirus isolate #8544, complete sequence	71.6	71.6	100%	5e-10	96%	DQ666911.1
Avian pneumovirus strain LAH A, complete genome	71.6	71.6	100%	5e-10	96%	AY640317.1
Avian pneumovirus nucleocapsid protein (N) mRNA, complete cds	71.6	71.6	100%	5e-10	96%	U39295.1
Avian metapneumovirus isolate N0208 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	66.2	66.2	100%	2e-08	93%	HM638199.1
Avian metapneumovirus strain SHSBR662/03 nonfunctional nucleoprotein mRNA, partial sequence	51.8	51.8	71%	5e-04	94%	DQ175638.1
Human metapneumovirus strain hMPV/Karaikal/KOM 57/2012 nucleoprotein gene, partial cds	46.4	46.4	91%	0.020	86%	KX426266.1
Human metapneumovirus isolate KUMC-MP, complete genome	46.4	46.4	80%	0.020	89%	KF516922.1
Human metapneumovirus strain HMPV/Homo sapiens/PER/FLE0425/2009/A, complete genome	46.4	46.4	80%	0.020	89%	KJ627435.1

B.



Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected:0

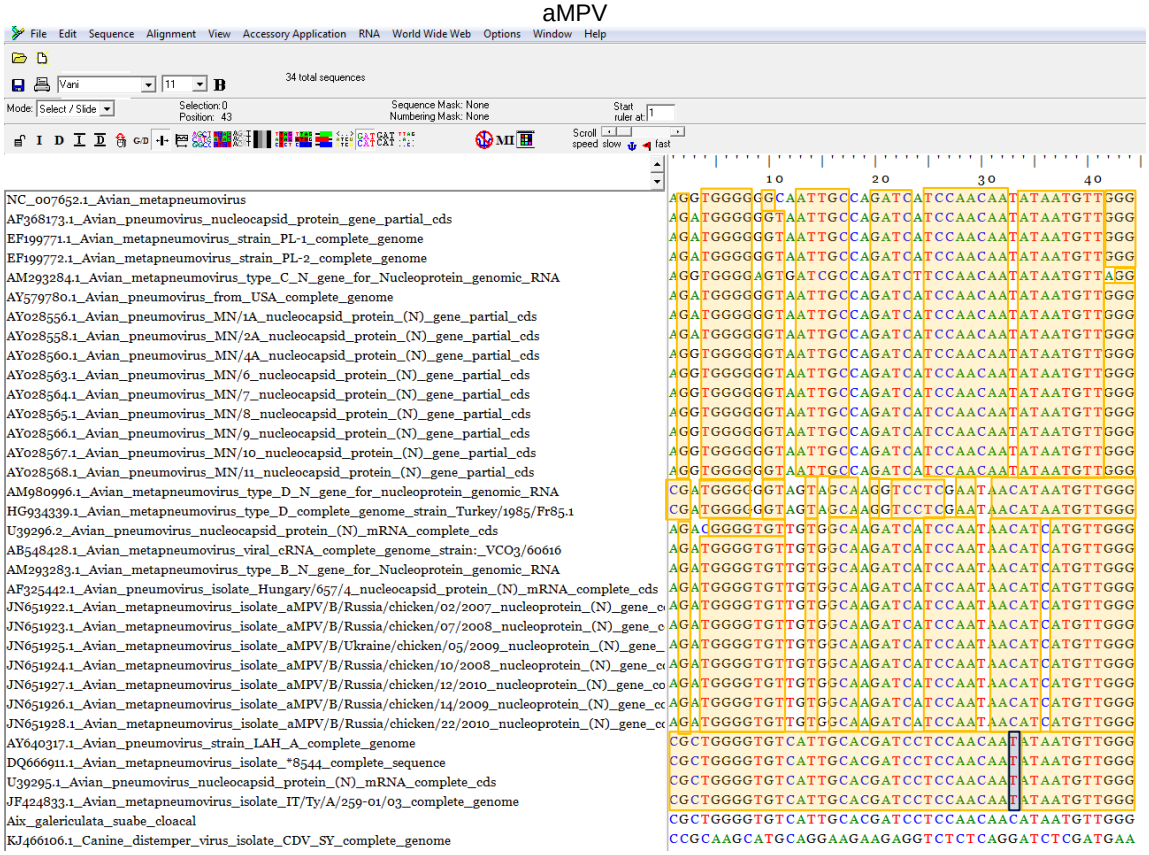
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Avian metapneumovirus isolate IT/Ty/A/259-01/03, complete genome	89.7	89.7	96%	3e-15	98%	JF424833.1
Avian metapneumovirus vaccine strain A nucleocapsid (N) gene, partial cds	89.7	89.7	96%	3e-15	98%	GU383068.1
Avian metapneumovirus isolate #8544, complete sequence	89.7	89.7	96%	3e-15	98%	DQ666911.1
Avian pneumovirus strain LAH A, complete genome	89.7	89.7	96%	3e-15	98%	AY640317.1
Avian pneumovirus nucleocapsid protein (N) mRNA, complete cds	89.7	89.7	96%	3e-15	98%	U39295.1
Avian metapneumovirus isolate N0208 nucleocapsid protein (N) gene, complete cds	86.0	86.0	96%	3e-14	96%	HM638199.1
Human metapneumovirus strain hMPV/Karaikal/KOM 57/2012 nucleoprotein gene, partial cds	57.2	57.2	85%	2e-05	87%	KX426266.1
Human metapneumovirus isolate KUMC-MP, complete genome	57.2	57.2	85%	2e-05	87%	KF516922.1
Human metapneumovirus strain HMPV/Homo sapiens/PER/FLE0425/2009/A, complete genome	57.2	57.2	85%	2e-05	87%	KJ627435.1
Human metapneumovirus strain HMPV/Homo sapiens/PER/FLA6941/2009/A, complete genome	57.2	57.2	85%	2e-05	87%	KJ627431.1
Human metapneumovirus strain HMPV/Homo sapiens/PER/FLA4809/2008/A, complete genome	57.2	57.2	85%	2e-05	87%	KJ627383.1
Human metapneumovirus isolate ANK/2013/370N nucleoprotein (N) gene, partial cds	57.2	57.2	85%	2e-05	87%	KJ152596.1
Human metapneumovirus isolate ANK/2013/336N nucleoprotein (N) gene, partial cds	57.2	57.2	85%	2e-05	87%	KJ152594.1

A. Amostra de *Aix galeticulata*. **B.** Amostra de *Egretta thula*

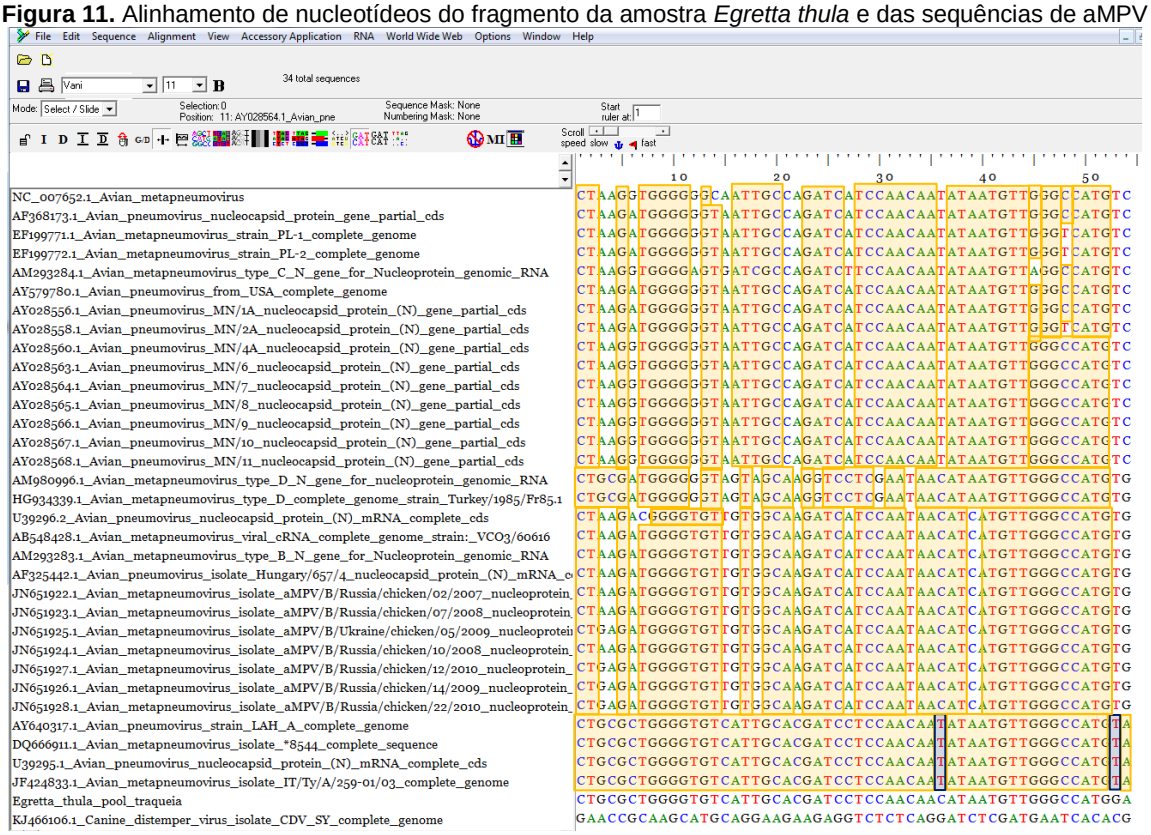
A análise dos nucleotídeos a partir do alinhamento das sequências, mostrou que os fragmentos obtidos se anelaram a uma região extremamente conservada do gene. O fragmento de *Aix galericulata* diferiu em apenas um nucleotídeo em relação às sequências do subtipo A (Figura 10), enquanto o fragmento de *Egretta thula* possuia dois nucleotídeos diferentes quanto às mesmas sequências do subtipo A (Figura 11).

Figura 10. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da amostra *Aix galericulata* e das sequências de aMPV



Os retângulos amarelos indicam os nucleotídeos conversados entre o fragmento obtidos e as sequências dos subtipos de aMPV; o retângulo azul indica o nucleotídeo que diferiu entre o fragmento e as sequências do subtipo A

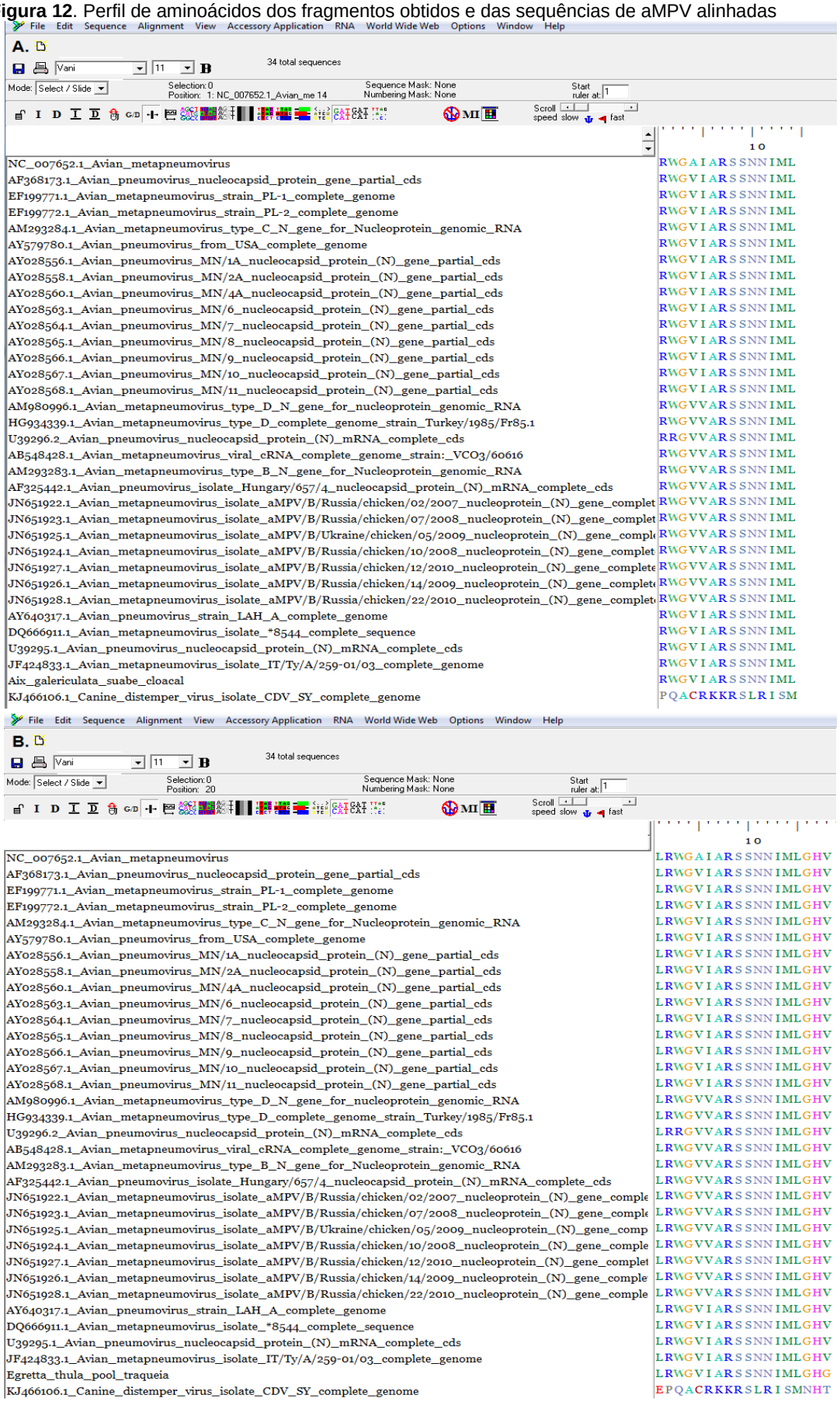
Figura 11. Alinhamento de nucleotídeos do fragmento da amostra *Egretta thula* e das sequências de aMPV



Os retângulos amarelos indicam os nucleotídeos conversados entre o fragmento obtidos e as sequências dos subtipos de aMPV; os retângulos azuis indicam os nucleotídeos que diferiram entre o fragmento e as sequências do subtipo A

A região também se mostrou altamente conservada quanto ao seu perfil de aminoácidos (Figura 12), que se mostrou inalterado, com exceção do último, no fragmento da amostra de *Egretta thula* (Figura 12B).

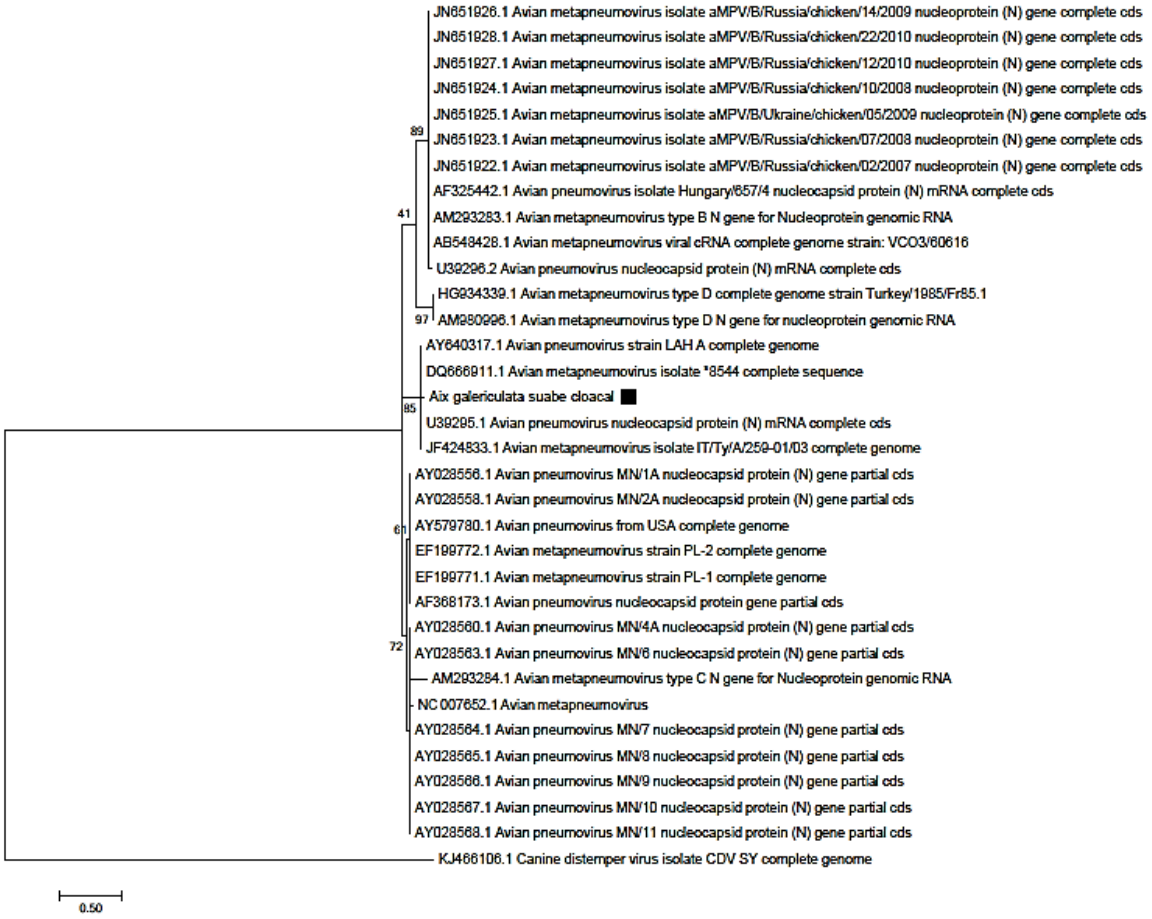
Figura 12. Perfil de aminoácidos dos fragmentos obtidos e das sequências de aMPV alinhadas



A. Sequência de aminoácidos obtida a partir do fragmento da amostra de *Aix galericulata* ; **B.** Sequência de aminoácidos obtida a partir do fragmento da amostra de *Egretta thula*

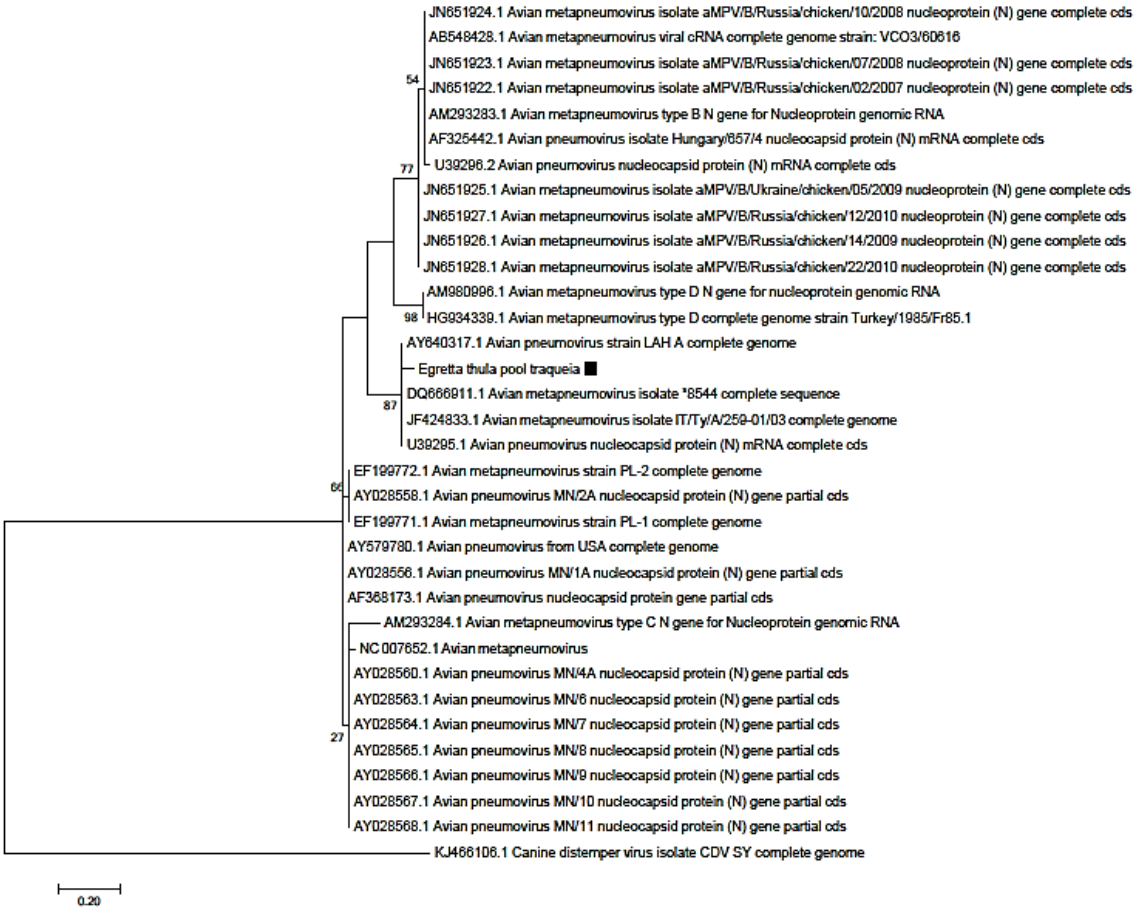
As árvores obtidas para ambas as sequências agruparam-se com os isolados pertencentes ao subtipo A. A amostra de suabe cloacal de *Aix galericulata* apresentou 85% de identidade com as sequências AY640317.1, JF424833.1, DQ666911.1 e U39295.1 (Figura 13) e a amostra de tecido de traqueia de *Egretta thula* apresentou 87% de identidade com as mesmas sequências supracitadas (Figura 14). Tais isolados, que se agruparam com nossas amostras eram provenientes principalmente de isolados vacinais #8544 e LAH A.

Figura 13. Árvore filogenética contendo o fragmento da amostra de *Aix galericulata*



Amostra **Aix galericulata suabe cloacal** ■. Análise filogenética foi inferida usando o método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Jukes-Cantor com distribuição Gamma discreta (5 categorias (+G, parâmetro = 1,4889)) e *bootstrap* de 1000 réplicas. A análise realizada a partir do gene N utilizando 32 sequências de aMPV com 44 nucleotídeos, o fragmento da amostra de *Aix galericulata* e uma sequência de Canine Distemper Virus como *outgroup*. A porcentagem nas quais as amostras se agrupam é apresentada ao lado dos ramos

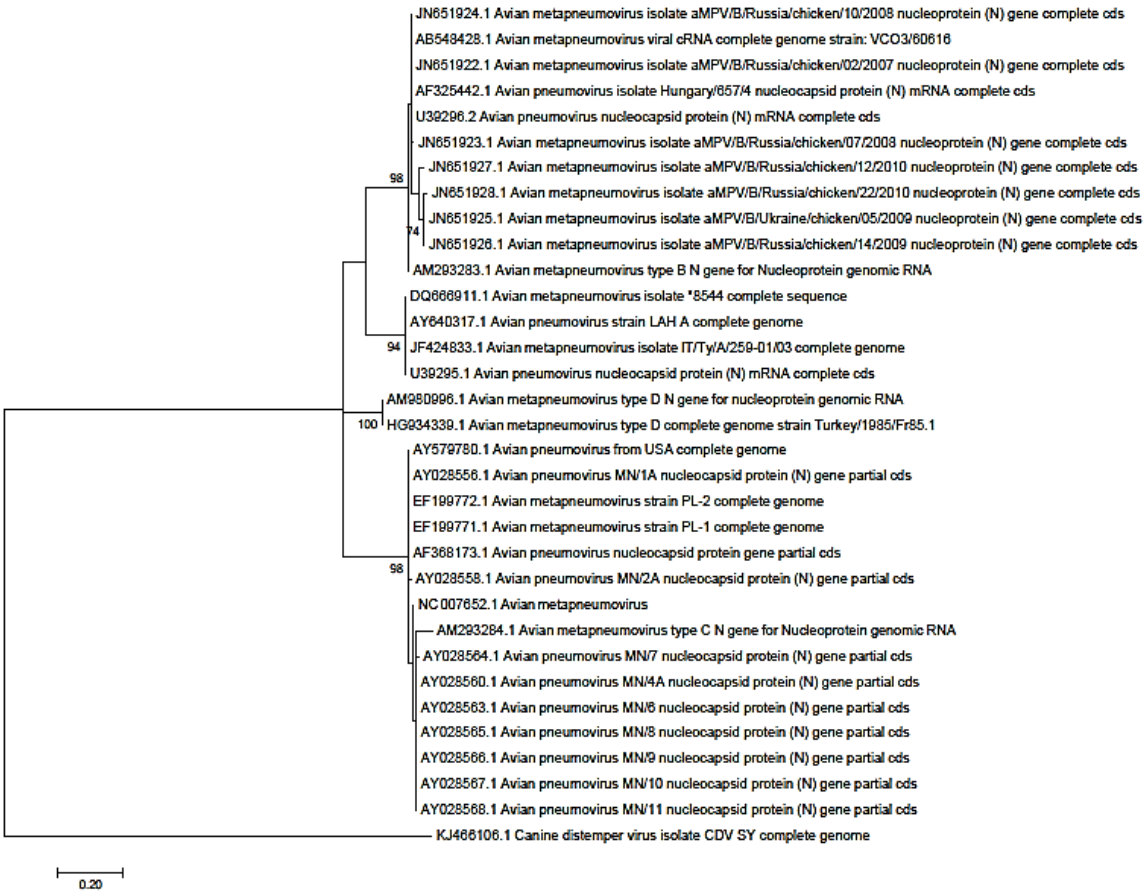
Figura 14. Árvore filogenética contendo o fragmento da amostra de *Egretta thula*



Amostra *Egretta thula* pool traqueia ■. Análise filogenética foi inferida usando o método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Jukes-Cantor e *bootstrap* de 1000 réplicas. A análise realizada a partir do gene N utilizando 32 sequências de aMPV com 54 nucleotídeos, o fragmento da amostra de *Egretta thula* e uma sequência de Canine Distemper Virus como *outgroup*. A porcentagem nas quais as amostras se agrupam é apresentada ao lado dos ramos

Por se tratar de fragmentos pequenos, uma árvore utilizando apenas sequências maiores anteriormente utilizadas também foi gerada, para confirmar os agrupamentos obtidos das árvores geradas para as duas amostras (Figura 15).

Figura 15. Árvore filogenética contendo sequências de aMPV



Análise filogenética foi inferida usando o método *Maximum Likelihood* baseado no modelo Kimura 2 com distribuição Gamma discreta (5 categorias (+G, parâmetro = 1.5733)) e *bootstrap* de 1000 réplicas. A análise realizada a partir do gene N utilizando 32 sequências de aMPV com 132 nucleotídeos, e uma sequência de Canine Distemper Virus como *outgroup*.

6 DISCUSSÃO

Infecções do trato respiratório são uma grande ameaça para a indústria avícola devido a alta mortalidade, baixo rendimento de carcaça além da redução da produção e qualidade de ovos que podem ocasionar. Vírus da Influenza Aviária, Vírus da Bronquite Infecciosa, Vírus da doença de Newcastle e o Metapneumovírus Aviário formam o grupo de patógenos virais respiratórios de maior importância para a avicultura (JONES, 1996; 2010; HUTTON S. et al., 2017).

Um fato agravante a esse cenário, são as aves silvestres, que podem se portar como reservatórios ou vetores de tais patógenos (SHIN et al., 2001; ALEXANDER, 2007; CHU et al., 2011; CHA; YU; ZSAK, 2013), inserindo-os em

diferentes territórios ou ambientes e disseminando-os para outras aves, inclusive para as aves de produção.

O metapneumovírus aviário já foi identificado em diversas aves silvestres, principalmente nas que estão incluídas na ordem dos Anseriformes, Passeriformes, Columbiformes e Pelecanidormes. A presença do subtipo C já foi comprovada nos EUA e em países da Europa, em amostras de gansos e patos selvagens, gansos selvagens do Canadá, cercetas azuis, estorninhos, pardais, andorinhas, corvos americanos além de gaivotas, garças e pombos (SHIN et al., 2000; BENNETT et al., 2002; SHIN et al., 2002b; BENNETT et al., 2004; TURPIN et al., 2008; VAN BOHEEMEN et al., 2012). Já os subtipos A e B foram detectados em amostras de marreca toicinho, pato corredor, irerê, periquitão maracanã, jacupemba e pombo (FELIPPE et al., 2011).

No nosso estudo, o aMPV A foi detectado em amostras de Anseriformes (*Aix galericulata, Aix sponsa* e *Dendrocygna viduata*), Columbiformes (*Columbia livia*), Pelecaniformes (*Egretta thula*), Psittaciformes (*Aratinga leucophtalma*) e Falconiforme (*Falco spaverius*) o que está em concordância com estudos antecedentes, principalmente com os dados de FELIPPE et al. (2011) que detectou o vírus em amostras de Anseriformes, Columbiformes e Psittaciformes, principalmente.

Ainda que alguns autores relatem a dificuldade em detectar certos vírus em amostras cloacais por conter inibidores de PCR (WILDE; EIDEN; YOLKEN, 1990; DAS et al., 2006), o tipo de suabe ou a forma de processamento pareceu não ser um fator limitante, visto que o vírus foi detectado em amostras tanto de suabes orofaringeanos ou cloacais quanto em amostras que possuíam os dois tipos de suabes agrupados.

Um estudo anterior feito com influenza aviária e o vírus da doença de Newcastle, demonstrou não haver diferença estatística na detecção dos vírus, seja por RRT-PCR seja por vírus neutralização, a partir de suabes agrupados entre 1, 5 ou 11 em um único tubo (SPACKMAN et al., 2013). Embora tal estudo tenha sido realizado com aves de produção em que a carga viral é maior quando comparada a carga de aves silvestres, o agrupamento das nossas amostras levou em consideração o local onde as aves estavam alojadas; de forma que, se uma ave apresentar o vírus é muito provável que as outras aves presentes no mesmo recinto também o possuam. Nossos resultados parecem estar de acordo

com os dados da literatura, visto que não houve diferença na detecção entre amostras testadas individualmente ou agrupadas em *pools* de até cinco animais.

Nossos resultados foram similares aos de outros estudos onde a detecção viral foi obtida a partir de amostras cloacais coletadas de gansos-das-neves, gansos selvagens, patos d'asa azul der se dado a partir de amostras cloacais (BENNETT et al., 2002; BENNETT et al., 2004), Inclusive, a maioria das amostras positivas encontradas por Felippe e colaboradores (FELIPPE et al., 2011), também eram provenientes de amostras cloacais. Além disso, a detecção a partir de amostras individuais de suabes cloacais ou contendo suabes traqueais e cloacais agrupados, também já foi documentada para outros vírus respiratórios, como os vírus de Newcastle e Influenza (ALEXANDER, 2007; THOMAZELLI et al., 2012; DE ARAUJO et al., 2014).

A detecção viral dos metapneumovírus tem sido feita por RT-PCR há pelo menos duas décadas, utilizando principalmente *primers* com alvo nos genes M, G, F e N. O estudo de referência dos *primers* utilizados em nosso teste baseado no gene N, afirmou que *primers* que tem alvo no gene N apresentaram os melhores resultados quanto a detecção, sendo capaz de detectar todos os isolados de aMPV testados (BÄYON-AUBOYER et al., 1999). De fato, apesar do aMPV ser o alvo de detecção em ambos os testes empregados em nosso trabalho, apenas o teste de RT-PCR baseado no gene N, foi capaz de detectar o vírus nas amostras testadas. Talvez a melhor detectabilidade desse teste possa ser explicada pela polaridade da molécula durante o processo de transcrição, no qual os genes mais próximos da região *leader* são transcritos de forma mais abundante que os genes mais próximos a região *trailer* do genoma (BANERJEE; BARIK, 1992; BARIK, 2004).

Ainda assim, a possível explicação para a divergência de resultados entre o RT-PCR baseado no gene N e o RRT-PCR baseado no gene G seja deveras a escolha do gene alvo, visto que um teste comparativo entre as técnicas de RT-PCR e RRT-PCR para detecção de aMPV subtipo A, ambos baseados no gene N, observou que as duas técnicas foram capazes de detectar todos os isolados testados (FERREIRA et al., 2009).

A detecção e isolamento do aMPV é desafiadora e um tanto frustrante, principalmente a partir de aves silvestres. Além do vírus se replicar mal no hospedeiro, ele permanece detectável por um curto período de tempo, tornando

a taxa de recuperação muito baixa, assim, um resultado negativo nem sempre significa ausência do vírus (SHIN et al., 2002a; TURPIN et al., 2008). Mesmo em aves comerciais, onde há presença de sintomatologia clínica, o isolamento é difícil, visto que, no pico dos sinais clínicos a carga viral já se encontra baixa (COOK, J. K., 2000). Talvez o principal entrave, seja a baixa carga viral que esses animais apresentam.

Embora o artigo de referência do par de oligos afirme que são específicos para a detecção de aMPV e que nenhum fragmento do vírus La Sota (NDV) foi amplificado (BÄYON-AUBOYER et al., 1999) ao fazermos o teste com tal vírus, uma banda fraca, um pouco abaixo do tamanho esperado foi observada (dados não mostrados). Junto a isso, algumas amostras positivas para aMPV também foram positivas quando testadas por RT-PCR direcionada contra o gene N para detecção de NDV (dados não mostrados). O fato levantou a questão quanto a detecção de falsos positivos, já que, além do gene N ser um dos genes mais conservados entre os paramixovírus (LAMB; PARKS, 2013), todas as amostras foram negativas pelo teste de RRT-PCR baseado no gene G, que geralmente é mais específico devido a utilização da sonda marcada (SPACKMAN, 2014).

Os principais métodos para isolamento e enriquecimento viral de aMPV são a passagem do vírus em cultura de órgão de traqueia (TOC) ou em ovos embrionados (OIE, 2009). O método de escolha para enriquecimento viral das amostras positivas foi a passagem em ovos embrionados de galinhas SPF, e se mostrou válido, visto que o sequenciamento parcial só foi possível após a passagem das amostras em ovos.

Das amostras positivas, foi possível fazer o sequenciamento e caracterização de duas (14%) amostras detectadas. Essa dificuldade de isolamento e caracterização já foi observada por outros autores (BENNETT et al., 2002; SHIN et al., 2002b), que relatam a necessidade de até nove passagens para obter sucesso no isolamento do vírus (GOYAL et al., 2000).

A análise filogenética mostrou que ambas as amostras se agruparam com isolados que pertencem ao subtipo A. Dos quatro isolados que se agruparam, apenas um era cepa de campo, que foi detectado em um surto de 1985 na Inglaterra e país de Gales, que foi atenuado e usado como progenitor para vacinas (MCDOUGALL; COOK, 1986; COOK, J. K. A.; ELLIS, 1990; LI et al., 1996). Isso nos leva a crer que os vírus detectados em nosso trabalho, podem

ser derivado de uma cepa vacinal, posto que, as sequências da cepa atenuada e da cepa vacinal (COOK, J. K. A.; ELLIS, 1990; NAYLOR, C. J. et al., 2004) também foram agrupados com nossos isolados. O resultado encontrado pode ter sido um tanto tendencioso visto que há poucas sequências do gene N de isolados de campo disponíveis no GenBank; associado a isto está a escolha em excluir algumas sequências para formar uma árvore com menos *gaps* e maior número de nucleotídeos possíveis.

As duas amostras também se agruparam com o isolado IT/Ty/A/259-01/03, que se trata de uma cepa virulenta derivada de reversão vacinal. No entanto, devido ao curta extensão dos fragmentos obtidos neste estudo, a identificação das mutações associadas à reversão à virulência, no intuito de verificar se nossas cepas são atenuadas, vacinais ou virulentas, não foi possível.

A reversão de virulência de estirpes vacinais já havia sido demonstrada em condições experimentais por NAYLOR, C. J.; JONES (1994) e mais tarde em situações de campo devido a vacinações mal empregadas que induzem a imunidade de forma ineficiente, de forma que o vírus pode passar de aves vacinadas para não vacinadas (inclusive as silvestres) e então recuperar sua virulência (NAYLOR, C. J.; JONES, 1994; CATELLI et al., 2006).

A transmissão viral de aves comerciais para aves silvestres, foi subestimada por muitos anos e, só recentemente estudos investigando esse fenômeno tem surgido (GARCIA et al., 2013; DEVLIN et al., 2016). A detecção de cepas vacinais em aves silvestres tem sido casa vez mais descrita e está de acordo com os nossos achados. Essa transmissão ocorre a partir de vírus vacinais vivos atenuados, e pode acarretar grandes consequências como reversão de virulência e multiplicação nessas aves que não são protegidas pela vacinação (AYALA et al., 2016; DEVLIN et al., 2016). Alguns autores detectaram e analisaram sequências de NDV e IBV a partir de amostras de Anseriformes, Columbiformes e Charadriiformes e constataram altíssima similaridade com cepas vacinais em mais de oito países, denunciando o caráter mundial que esse fenômeno de escape pode ter (HUGHES et al., 2009; AYALA et al., 2016).

7 CONCLUSÕES

O trabalho investigou e detectou a presença do Metapneumovírus Aviário a partir de amostras de aves silvestres e sinantrópicas. Apesar do pequeno tamanho do fragmento tornar difícil a avaliação dos nossos isolados frente aos descritos previamente, as amostras sequenciadas mostraram ser pertencentes ao subtipo A, apresentando considerável identidade com as estirpes derivadas de vacina e com estirpes vacinais. Desse modo, os resultados nos levam a acreditar que houve ocorrência de excreção das cepas vacinais de aves de produção para o ambiente e para as aves silvestres. Novos estudos se fazem necessários para o contínuo monitoramento do vírus, compreensão da epidemiologia da doença e da ecologia das aves silvestres frente a esse patógeno. Além de contribuir para o controle sanitário da doença e adoção de medidas necessárias de biossegurança também para a avifauna silvestre do país

8 REFERÊNCIAS

ABDEL-AZEEM, A. A.; FRANZO, G.; DALLE ZOTTE, A.; DRIGO, M.; CATELLI, E.; LUPINI, C.; MARTINI, M.; CECCHINATO, M. First evidence of avian metapneumovirus subtype A infection in turkeys in Egypt. **Trop Anim Health Prod**, v. 46, n. 6, p. 1093-1097, 2014.

ALEXANDER, D. J. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. **J Comp Pathol**, v. 112, n. 2, p. 105-126, 1995.

ALEXANDER, D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5637-5644, 2007.

ARNS, C. W.; HAFEZ, H. M. Swollen head syndrome in poultry flocks in Brazil. In: Proceedings of the 41st Western Poultry Disease Conference., 1992, Sacramento, USA, p. 81-84.

AYALA, A. J.; DIMITROV, K. M.; BECKER, C. R.; GORAICHUK, I. V.; ARNS, C. W.; BOLOTIN, V. I.; FERREIRA, H. L.; GERILOVYCH, A. P.; GOUJGOULOVA, G. V.; MARTINI, M. C.; MUZYKA, D. V.; ORSI, M. A.; SCAGION, G. P.; SILVA, R. K.; SOLODIANKIN, O. S.; STEGNIY, B. T.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. Presence of Vaccine-Derived Newcastle Disease Viruses in Wild Birds. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162484, 2016.

BANERJEE, A. K.; BARIK, S. Gene Expression of Vesicular Stomatitis Virus Genome RNA. **Virology**, v. 188, n., p. 417-428, 1992.

BANET-NOACH, C.; SIMANOV, L.; PERK, S. Characterization of Israeli avian metapneumovirus strains in turkeys and chickens. **Avian Pathol**, v. 34, n. 3, p. 220-226, 2005.

BANET-NOACH, C.; SIMANOV, L.; LAHAM-KARAM, N.; PERK, S.; BACHARACH, E. Longitudinal Survey of Avian Metapneumoviruses in Poultry in Israel: Infiltration of Field Strains into Vaccinated Flocks. **Avian Diseases**, v. 53, n., p. 184–189, 2009.

BARIK, S. Control of nonsegmented negative-strand RNA virus replication by siRNA. **Virus Research**, v. 102, n. 1, p. 27-35, 2004.

BAYON-AUBOYER, M. H.; ARNAULD, C.; TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N. Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian

pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. **J Gen Virol**, v. 81, n. Pt 11, p. 2723-2733, 2000.

BÄYON-AUBOYER, M. H.; JESTIN, V.; TOQUIN, D.; CHERBONNEL, M.; ETERRADOSSI, N. Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. **Arch Virol**, v. 144, n. 6, p. 1091-1109, 1999.

BELAK, S.; KARLSSON, O. E.; BLOMSTROM, A. L.; BERG, M.; GRANBERG, F. New viruses in veterinary medicine, detected by metagenomic approaches. **Vet Microbiol**, v. 165, n. 1-2, p. 95-101, 2013.

BENNETT, R. S.; MCCOMB, B.; SHIN, H. J.; NJENGA, M. K.; NAGARAJA, K. V.; HALVORSON, D. A. Detection of avian pneumovirus in wild Canada (Branta canadensis) and blue-winged teal (Anas discors) geese. **Avian Dis**, v. 46, n. 4, p. 1025-1029, 2002.

BENNETT, R. S.; NEZWORSKI, J.; VELAYUDHAN, B. T.; NAGARAJA, K. V.; ZEMAN, D. H.; DYER, N.; GRAHAM, T.; LAUER, D. C.; NJENGA, M. K.; HALVORSON, D. A. Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. **Avian Dis**, v. 48, n. 4, p. 902-908, 2004.

BROWN, P. A.; LEMAITRE, E.; BRIAND, F. X.; COURTILLON, C.; GUIONIE, O.; ALLEE, C.; TOQUIN, D.; BAYON-AUBOYER, M. H.; JESTIN, V.; ETERRADOSSI, N. Molecular Comparisons of Full Length Metapneumovirus (MPV) Genomes, Including Newly Determined French AMPV-C and -D Isolates, Further Supports Possible Subclassification within the MPV Genus. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p., 2014.

BUYS, S. B.; DU PREEZ, J. H. A preliminary report on the isolation of virus causing sinusitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. **Turkeys**, v. 28, n., p. 36-46, 1980.

BUYS, S. B.; DU PREEZ, J. H.; ELS, H. J. The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 56, n., p. 87-98, 1989.

BUYS, S. B.; DU PREEZ, J. H.; ELS, H. J. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. **J S Afr Vet Assoc**, v. 60, n. 4, p. 221-222, 1989.

CADMAN, H. F.; KELLY, P. J.; ZHOU, R.; DAVELAAR, F.; MASON, P. R. A serosurvey using enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against

poultry pathogens in ostriches (Struthio camelus) from Zimbabwe. **Avian Dis**, v. 38, n. 3, p. 621-625, 1994.

CAPOBIANCHI, M. R.; GIOMBINI, E.; ROZERA, G. Next-generation sequencing technology in clinical virology. **Clin. Microbiol. Infect**, v. 19, n., p. 15-22, 2013.

CATELLI, E.; CECCHINATO, M.; SAVAGE, C. E.; JONES, R. C.; NAYLOR, C. J. Demonstration of loss of attenuation and extended field persistence of a live avian metapneumovirus vaccine. **Vaccine**, v. 24, n. 42-43, p. 6476-6482, 2006.

CECCHINATO, M.; CATELLI, E.; LUPINI, C.; RICCHIZZI, E.; CLUBBE, J.; BATTILANI, M.; NAYLOR, C. J. Avian metapneumovirus (AMPV) attachment protein involvement in probable virus evolution concurrent with mass live vaccine introduction. **Vet Microbiol**, v. 146, n. 1-2, p. 24-34, 2010.
CHA, R. M.; YU, Q.; ZSAK, L. The pathogenicity of avian metapneumovirus subtype C wild bird isolates in domestic turkeys. **Virol J**, v. 10, n., p. 38, 2013.

CHACON, J. L.; BRANDAO, P. E.; BUIM, M.; VILLARREAL, L.; FERREIRA, A. J. Detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and molecular characterization of subtype B avian metapneumovirus isolated in Brazil. **Avian Pathol**, v. 36, n. 5, p. 383-387, 2007.

CHACON, J. L.; MIZUMA, M.; VEJARANO, M. P.; TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N.; PATNAYAK, D. P.; GOYAL, S. M.; FERREIRA, A. J. Avian metapneumovirus subtypes circulating in Brazilian vaccinated and nonvaccinated chicken and turkey farms. **Avian Dis**, v. 55, n. 1, p. 82-89, 2011.

CHU, D. K.; LEUNG, C. Y.; GILBERT, M.; JOYNER, P. H.; NG, E. M.; TSE, T. M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S.; POON, L. L. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **J Virol**, v. 85, n. 23, p. 12815-12820, 2011.

COLLINS, M. S.; GOUGH, R. E.; ALEXANDER, D. J. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. **Avian Pathology**, v. 22, n., p. 469-479, 1993.

COLLINS, P. L.; MCINTOSH, K.; CHANOCK, R. M. **Respiratory syncytial virus,**. Philadelphia: Lippincott-Wilkins, 1996
COOK, J. K.; ELLIS, M. M.; HUGGINS, M. B. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. **Avian Pathol**, v. 20, n. 1, p. 155-166, 1991.

COOK, J. K.; HUGGINS, M. B.; WOODS, M. A.; ORBELL, S. J.; MOCKETT, A. P. Protection provided by a commercially available vaccine against different strains of turkey rhinotracheitis virus. **Vet Rec**, v. 136, n. 15, p. 392-393, 1995.

COOK, J. K. Avian rhinotracheitis. **Rev Sci Tech**, v. 19, n. 2, p. 602-613, 2000.

COOK, J. K.; CAVANAGH, D. Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). **Avian Pathol**, v. 31, n. 2, p. 117-132, 2002.

COOK, J. K. A.; ELLIS, M. M. Attenuation of turkey rhinotracheitis virus by alternative passage in embryonated chicken eggs and tracheal organ cultures. **Avian Pathology**, v. 19, n., p. 181-185, 1990.

COOK, J. K. A.; JONES, B. V.; ELLIS, M. M.; JING, L.; CAVANAGH, D. Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. **Avian Pathology**, v. 22, n., p. 257-273, 1993.

COOK, J. K. A.; HUGGINS, M. B.; ORBELL, S. J.; SENNE, D. A. Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. **Avian Pathology**, v. 28, n. 6, p. 607-617, 1999.

D'ARCE, R. C.; COSWIG, L. T.; ALMEIDA, R. S.; TREVISOL, I. M.; MONTEIRO, M. C.; ROSSINI, L. I.; DI FABIO, J.; HAFEZ, H. M.; ARNS, C. W. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction. **Avian Pathol**, v. 34, n. 2, p. 133-136, 2005.

DANI, M. A.; DURIGON, E. L.; ARNS, C. W. Molecular characterization of Brazilian avian pneumovirus isolates: comparison between immunochemiluminescent Southern blot and nested PCR. **J Virol Methods**, v. 79, n. 2, p. 237-241, 1999.

DAS, A.; SPACKMAN, E.; SENNE, D.; PEDERSEN, J.; SUAREZ, D. L. Development of an Internal Positive Control for Rapid Diagnosis of Avian Influenza Virus Infections by Real-Time Reverse Transcription-PCR with Lyophilized Reagents. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n., p. 3065-3073, 2006.

DE ARAUJO, J.; DE AZEVEDO, S. M., JR.; GAIDET, N.; HURTADO, R. F.; WALKER, D.; THOMAZELLI, L. M.; OMETTO, T.; SEIXAS, M. M.; RODRIGUES, R.; GALINDO, D. B.; DA SILVA, A. C.; RODRIGUES, A. M.; BOMFIM, L. L.; MOTA, M. A.; LARRAZABAL, M. E.; BRANCO, J. O.; SERAFINI, P.; NETO, I. S.; FRANKS, J.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G.; DURIGON, E. L. Avian influenza virus (H11N9) in migratory shorebirds wintering in the Amazon Region, Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110141, 2014.

DEVLIN, J. M.; VAZ, P. K.; COPPO, M. J.; BROWNING, G. F. Impacts of poultry vaccination on viruses of wild bird. **Current Opinion in Virology**, v. 19, n., p. 23-29, 2016.

EASTON, A. J.; DOMACHOWSKE, J. B.; ROSENBERG, H. F. Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. **Clin Microbiol Rev**, v. 17, n. 2, p. 390-412, 2004.

EL HOUADFI, M.; HAMMAM, A.; VANMARCHE, J.; COOK, J. K. A. Swollen head syndrome in broiler chicken in Morocco. In: 40th West. Poult. Dis. Conf. , 1991, Cancun, Mexico:Assoc. Nacl. Espec. Cienc. Avicolas, p. 126-127.

ETERRADOSSI, N.; TOQUIN, D.; GUITTET, M.; BENNEJEAN, G. Discrepancies in turkey rhinotracheitis ELISA results using different antigens. **Vet Rec**, v. 131, n. 24, p. 563-564, 1992.

FELIPPE, P. A.; SILVA, L. H.; SANTOS, M. B.; SAKATA, S. T.; ARNS, C. W. Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeons and wild birds in Brazil. **Avian Pathol**, v. 40, n. 5, p. 445-452, 2011.

FERREIRA, H. L.; SPILKI, F. R.; ALMEIDA, R. S.; SANTOS, M. M. A. B.; ARNS, C. W. Comparative evaluation of conventional RT-PCR and real-time RT-PCR (RRT-PCR) for detection of avian metapneumovirus subtype A. **Ciência Rural**, v. 39, n., p. 1445-1451, 2009.

GARCIA, S. C.; LOPEZ, R. N.; MORALES, R.; OLVERA, M. A.; MARQUEZ, M. A.; MERINO, R.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. Molecular Epidemiology of Newcastle Disease in Mexico and the Potential Spillover of Viruses from Poultry into Wild Bird Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 16, p. 4985-4992, 2013.

GILL, D. S.; CHATTOPADHYAY, D.; BANERJEE, A. K. Identification of a domain within the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus that is essential for transcription in vitro. **Proc. Nati. Acad. Sci.**, v. 83, n., p. 8873-8877, 1986.

GIRAUD, P.; BENNEJEAN, G.; GUITTET, M.; TOQUIN, D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. **Vet Rec**, v. 119, n. 24, p. 606-607, 1986.

GOUGH, R. E.; MANVELL, R. J.; DRURY, S. E.; PEARSON, D. B. Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens. **Vet Rec**, v. 134, n. 14, p. 353-354, 1994.

GOULD, P. S.; EASTON, A. J. Coupled translation of the respiratory syncytial virus M2 ORFs requires upstream sequences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n., p. 21972-21980, 2005.

GOYAL, S. M.; CHIANG, S. J.; DAR, A. M.; NAGARAJA, K. V.; SHAW, D. P.; HALVORSON, D. A.; KAPUR, V. Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. **J Vet Diagn Invest**, v. 12, n. 2, p. 166-168, 2000.

GOYAL, S. M.; LAUER, D.; FRIENDSHUH, K.; HALVORSON, D. A. Seroprevalence of avian pneumovirus in Minnesota turkeys. **Avian Dis**, v. 47, n. 3, p. 700-706, 2003.

GRANT, M.; BAXTER-JONES, C.; WILDING, G. P. An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection. **Veterinary Record**, v. 120, n., p. 279-280, 1987.

GUIONIE, O.; TOQUIN, D.; SELLAL, E.; BOULEY, S.; ZWINGELSTEIN, F.; ALLEE, C.; BOUGEARD, S.; LEMIERE, S.; ETERRADOSSI, N. Laboratory evaluation of a quantitative real-time reverse transcription PCR assay for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumovirus. **J Virol Methods**, v. 139, n. 2, p. 150-158, 2007.

HAFEZ, H. M. The role of pneumovirus in swollen head syndrome of chickens: review. **Arch.Geflugelkde**, v. 57, n., p. 181-185, 1993.

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, n., p. 95-98, 1999.

HUANG, Y. T.; COLLINS, P. L.; WERTZ, G. W. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. **Virus Res**, v. 2, n., p. 157-173, 1985.

HUGHES, L. A.; SAVAGE, C.; NAYLOR, C.; BENNETT, M.; CHANTREY, J.; JONES, R. Genetically diverse coronaviruses in wild bird populations of northern England. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 7, p. 1091-1094, 2009.

HUTTON S.; BETTRIDGE J.; CHRISTLEY R.; HABTE T.; K., G. Detection of infectious bronchitis virus 793B, avian metapneumovirus, Mycoplasma gallisepticum and Mycoplasma synoviae in poultry in Ethiopia. **Trop Anim Health Prod**, v. 49, n., p. 317-322, 2017.

ICTV. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2016). **Arch Virol**, v. 161, n., p., 2016.

JIRJIS, F. F.; NOLL, S. L.; HALVORSON, D. A.; NAGARAJA, K. V.; SHAW, D. P. Pathogenesis of avian pneumovirus infection in turkeys. **Vet Pathol**, v. 39, n. 3, p. 300-310, 2002.

JONES, R. C.; WILLIAMS, R. A.; BAXTER-JONES, C.; SAVAGE, C. E.; WILDING, G. P. Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. **Avian Pathol**, v. 17, n. 4, p. 841-850, 1988.

JONES, R. C.; NAYLOR, C. J.; BRADBURY, J. M.; SAVAGE, C. E.; WORTHINGTON, K.; WILLIAMS, R. A. Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England. **Vet Rec**, v. 129, n. 23, p. 509-510, 1991.

JONES, R. C. Avian pneumovirus infection: Questions still unanswered. **Avian Pathol**, v. 25, n. 4, p. 639-648, 1996.

JONES, R. C. Viral respiratory diseases (ILT, aMPV infections, IB): are they ever under control? **British Poultry Science**, v. 51, n., p. 1-11, 2010.

JUHASZ, K.; EASTON, A. J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. **J Gen Virol**, v. 75 (Pt 11), n., p. 2873-2880, 1994.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n., p. 1870-1874, 2016.

LAMB, R. A.; PARKS, G. Paramyxoviridae. In: Knipe, D. M. e Howley , P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v.1, p.957-995.
LEE, E. H.; SONG, M. S.; SHIN, J. Y.; LEE, Y. M.; KIM, C. J.; LEE, Y. S.; KIM, H.; CHOI, Y. K. Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C isolated from pheasants in a live bird market. **Virus Res**, v., n., p., 2007.

LI, J.; LING, R.; RANDHAWA, J. S.; SHAW, K.; DAVIS, P. J.; JUHASZ, K.; PRINGLE, C. R.; EASTON, A. J.; CAVANAGH, D. Sequence of the nucleocapsid protein gene of subgroup A and B avian pneumoviruses. **Virus Res**, v. 41, n. 2, p. 185-191, 1996.

LING, R.; EASTON, A. J.; PRINGLE, C. R. Sequence analysis of the 22K, SH and G genes of turkey rhinotracheitis virus and their intergenic regions reveals a gene order different from that of other pneumoviruses. **J Gen Virol**, v. 73 (Pt 7), n., p. 1709-1715, 1992.
LING, R.; DAVIS, P. J.; YU, Q.; WOOD, C. M.; PRINGLE, C. R.; CAVANAGH, D.; EASTON, A. J. Sequence and in vitro expression of the phosphoprotein gene of avian pneumovirus. **Virus Res**, v. 36, n. 2-3, p. 247-257, 1995.

LU, Y. S.; SHIEN, Y. S.; TSAI, H. J.; TSENG, C. S.; LEE, S. H.; LIN, D. F. Swollen head syndrome in Taiwan-isolation of an avian pneumovirus and serological survey. **Avian Pathol**, v. 23, n. 1, p. 169-174, 1994.

LUPINI, C.; CECCHINATO, M.; RICCHIZZI, E.; NAYLOR, C. J.; CATELLI, E. A turkey rhinotracheitis outbreak caused by the environmental spread of a vaccine-derived avian metapneumovirus. **Avian Pathol**, v. 40, n. 5, p. 525-530, 2011.

LWAMBA, H. C.; ALVAREZ, R.; WISE, M. G.; YU, Q.; HALVORSON, D.; NJENGA, M. K.; SEAL, B. S. Comparison of the full-length genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses. **Virus Res**, v. 107, n. 1, p. 83-92, 2005.

MARSH, M.; HELENIUST, A. Virus Entry Into Animal Cells. **Advantages in Virus Research**, v. 36, n., p. 107-151, 1989.

MASE, M.; YAMAGUCHI, S.; TSUKAMOTO, K.; IMADA, T.; IMAI, K.; NAKAMURA, K. Presence of avian pneumovirus subtypes A and B in Japan. **Avian Dis**, v. 47, n. 2, p. 481-484, 2003.

MCDOUGALL, J. S.; COOK, J. K. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. **Veterinary Record**, v. 118, n. 8, p. 206-207, 1986.

NAYLOR, C.; SHAW, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Appearance of type B avian Pneumovirus in great Britain. **Avian Pathol**, v. 26, n. 2, p. 327-338, 1997.

NAYLOR, C. J.; JONES, R. C. Demonstration of a virulent subpopulation in a prototype live attenuated turkey rhinotracheitis vaccine. **Vaccine**, v. 12, n. 13, p. 1225-1230, 1994.

NAYLOR, C. J.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. The ectodomains but not the transmembrane domains of the fusion proteins of subtypes A and B avian pneumovirus are conserved to a similar extent as those of human respiratory syncytial virus. **J Gen Virol**, v. 79 (Pt 6), n., p. 1393-1398, 1998.

NAYLOR, C. J.; BROWN, P. A.; EDWORTHY, N.; LING, R.; JONES, R. C.; SAVAGE, C. E.; EASTON, A. J. Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. **J Gen Virol**, v. 85, n. Pt 11, p. 3219-3227, 2004.

O'BRIEN, J. D. Swollen head syndrome in broiler breeders. **Vet Rec**, v. 117, n. 23, p. 619-620, 1985.

OIE. Turkey rhinotracheitis. **OIE Terrestrial Manual**, v., n., p., 2009.

OWOADE, A. A.; DUCATEZ, M. F.; HUBSCHEN, J. M.; SAUSY, A.; CHEN, H.; GUAN, Y.; MULLER, C. P. Avian metapneumovirus subtype A in China and subtypes A and B in Nigeria. **Avian Dis**, v. 52, n. 3, p. 502-506, 2008.

PATTISON, M.; CHETTLE, N.; RANDALL, C. J.; WYETH, P. J. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. **Vet Rec**, v. 125, n. 9, p. 229-231, 1989.

PATTISON, M. TRT in the field: field situation and control. European perspective of TRT. In: Proceedings &Technical Supplements of the Roche Avian Pneumovirus Workshop,, 1998, p. 43-49.

PERELMAN, B.; MEROZ, M.; SAMBERG, Y. 'Swollen head syndrome' in broiler breeders in Israel. **Vet Rec**, v. 123, n. 17, p. 444, 1988.

PRACHAYANGPRECHA, S.; SCHAPENDONK, C. M. E.; KOOPMANS, M. P.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; SCHÜRCH, A. C.; D., P. S.; VAN DER EIJK, A. A.; POOVORAWAN, Y.; HAAGMANS, B.; SMITS, S. L. Exploring the Potential of Next-Generation Sequencing in Detection of Respiratory Viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n., p. 3722–3730, 2014.

RAHIMI, M. Seroprevalence of avian metapneumovirus infection in broiler and broiler breeder chickens in Iran. **Veterinarni Medicina**, v. 56, n., p. 395–399, 2011.

RANDHAWA, J. S.; WILSON, S. D.; TOLLEY, K. P.; CAVANAGH, D.; PRINGLE, C. R.; EASTON, A. J. Nucleotide sequence of the gene encoding the viral polymerase of avian pneumovirus. **J Gen Virol**, v. 77 (Pt 12), n., p. 3047-3051, 1996.

SEAL, B. S. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. **Virus Res**, v. 58, n. 1-2, p. 45-52, 1998.

SENNE, D. A.; EDSON, R. K.; PEDERSON, J. C.; PANIGRAHY, B. Avian pneumovirus update. In: 134th Annual Congress of American Veterinary Medical Association, 1997, p. 190.

SHIN, H. J.; NJENGA, M. K.; MCCOMB, B.; HALVORSON, D. A.; NAGARAJA, K. V. Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. **J Clin Microbiol**, v. 38, n. 11, p. 4282-4284, 2000.

SHIN, H. J.; NJENGA, M. K.; HALVORSON, D. A.; SHAW, D. P.; NAGARAJA, K. V. Susceptibility of ducks to avian pneumovirus of turkey origin. **Am J Vet Res**, v. 62, n. 7, p. 991-994, 2001.

SHIN, H. J.; CAMERON, K. T.; JACOBS, J. A.; TURPIN, E. A.; HALVORSON, D. A.; GOYAL, S. M.; NAGARAJA, K. V.; KUMAR, M. C.; LAUER, D. C.; SEAL, B. S.; NJENGA, M. K. Molecular epidemiology of subgroup C avian pneumoviruses isolated in the United States and comparison with subgroup a and B viruses. **J Clin Microbiol**, v. 40, n. 5, p. 1687-1693, 2002a.
SHIN, H. J.; NAGARAJA, K. V.; MCCOMB, B.; HALVORSON, D. A.; JIRJIS, F. F.; SHAW, D. P.; SEAL, B. S.; NJENGA, M. K. Isolation of avian pneumovirus from mallard ducks that is genetically similar to viruses isolated from neighboring commercial turkeys. **Virus Res**, v. 83, n. 1-2, p. 207-212, 2002b.

SPACKMAN, E.; PEDERSEN, J. C.; MCKINLEY, E. T.; GELB, J., JR. Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. **BMC Vet Res**, v. 9, n., p. 35, 2013.

SPACKMAN, E. Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. **Methods Mol Biol**, v. 1161, n., p. 105-118, 2014.

STUART, J. C. Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. In: Recent advances in turkey science. Poultry Science Symposium Series, 1989, London, UK:Butterworth & Co Publishers Ltd., p. 217-224.

SUGIYAMA, M.; ITO, H.; HATA, Y.; ONO, E.; ITO, T. Complete nucleotide sequences of avian metapneumovirus subtype B genome. **Virus Genes**, v. 41, n., p. 389–395, 2010.

SUN, S.; CHEN, F.; CAO, S.; LIU, J.; LEI, W.; LI, G.; SONG, Y.; LU, J.; LIU, C.; QIN, J.; LI, H. Isolation and characterization of a subtype C avian metapneumovirus circulating in Muscovy ducks in China. **Vet Res**, v. 45, n., p. 74, 2014.

TAKIMOTO, T.; PORTNER, A. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. **Virus Research**, v. 106, n., p. 133-145, 2004.

TANAKA, M.; KOKUMAI, N.; OBI, T.; HIGASHIHARA, R.; TAKUMA, H.; HIRAMATSU, K.; SHIMIZU, Y. A serological survey of turkey rhinotracheitis virus infection in chickens in Japan. **J Vet Med Sci**, v. 58, n. 7, p. 689-691, 1996.

THOMAZELLI, L.; DE ARAUJO, J.; FERREIRA, C. D. S.; HURTADO, R.; OLIVEIRA, D.; OMETTO, T.; GOLONO, M.; SANFILIPPO, L.; DEMETRIO, C.; FIGUEIREDO, M. Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic

and wild birds on the North Eastern Coast and Amazon biome of Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 14, n. 1, p. 01-07, 2012.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOQUIN, D.; ETERRADOSSI, N.; GUITTET, M. Use of a related ELISA antigen for efficient TRT serological testing following live vaccination. **Vet Rec**, v. 139, n. 3, p. 71-72, 1996.

TOQUIN, D.; BAYON-AUBOYER, M. H.; ETERRADOSSI, N.; JESTIN, V.; MORIN, H. Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. **Vet Rec**, v. 145, n. 23, p. 680, 1999.

TURPIN, E. A.; STALLKNECHT, D. E.; SLEMONS, R. D.; ZSAK, L.; SWAYNE, D. E. Evidence of avian metapneumovirus subtype C infection of wild birds in Georgia, South Carolina, Arkansas and Ohio, USA. **Avian Pathol**, v. 37, n. 3, p. 343-351, 2008.

UBABEF. **Relatório anual UBABEF 2014.** União Brasileira de Avicultura

VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T. M.; VERHAGEN, J. H.; OSTERHAUS, A. D.; PAS, S. D.; HERFST, S.; FOUCHIER, R. A. A family-wide RT-PCR assay for detection of paramyxoviruses and application to a large-scale surveillance study. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e34961, 2012.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; DE JONG, J. C.; GROEN, J.; KUIKEN, T.; DE GROOT, R.; FOUCHIER, R. A.; OSTERHAUS, A. D. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nat Med**, v. 7, n. 6, p. 719-724, 2001.

VAN DEN HOOGEN, B. G.; BESTEBROER, T. M.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; FOUCHIER, R. A. M. Analysis of the Genomic Sequence of a Human Metapneumovirus. v. 295, n., p. 119–132, 2002.

WEI, L.; ZHU, S.; YAN, X.; WANG, J.; ZHANG, C.; LIU, S.; SHE, R.; HU, F.; QUAN, R.; LIU, J. Avian metapneumovirus subgroup C infection in chickens, China. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 7, p. 1092-1094, 2013.

WILDE, J.; EIDEN, J.; YOLKEN, R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. v. 28, n., p. 1300-1307, 1990.

YU, Q.; DAVIS, P. J.; BARRETT, T.; BINNS, M. M.; BOURSNELL, M. E.; CAVANAGH, D. Deduced amino acid sequence of the fusion glycoprotein of turkey

rhinotracheitis virus has greater identity with that of human respiratory syncytial virus, a pneumovirus, than that of paramyxoviruses and morbilliviruses. **J Gen Virol**, v. 72 (Pt 1), n., p. 75-81, 1991.

YU, Q.; DAVIS, P. J.; BROWN, T. D.; CAVANAGH, D. Sequence and in vitro expression of the M2 gene of turkey rhinotracheitis pneumovirus. **J Gen Virol**, v. 73, n., p. 1355-1363, 1992a.

YU, Q.; DAVIS, P. J.; LI, J.; CAVANAGH, D. Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveal a gene order different from that of respiratory syncytial virus. **Virology**, v. 2, n., p. 426-234, 1992b.

YUN, B. L.; GUAN, X. L.; LIU, Y. Z.; GAO, Y. N.; WANG, Y. Q.; QI, X. L.; CUI, H. Y.; LIU, C. J.; ZHANG, Y. P.; GAO, L.; LI, K.; GAO, H. L.; GAO, Y. L.; WANG, X. M. Trypsin- and low pH-mediated fusogenicity of avian metapneumovirus fusion proteins is determined by residues at positions 100, 101 and 294. **Sci Rep**, v. 5, n., p., 2015.