UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JULIANA DE OLIVEIRA NAVARRO

Detecção e caracterização molecular de *Picobirnavirus* bovino na região centro-sul do Brasil

Pirassununga

2015

JULIANA DE OLIVEIRA NAVARRO

Detecção e caracterização moleculares de *Picobirnavirus* bovino na região centro-sul do Brasil

"Versão Corrigida"

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

N322d

Navarro, Juliana de Oliveira
Detecção e caracterização moleculares de *Picobirnavirus* bovino na região centro-sul do Brasil / Juliana de Oliveira Navarro. -- Pirassununga, 2015.
64 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Medicina Veterinária.
Área de Concentração: Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa.

1. *Picobirnavirus* bovino 2. Epidemiologia molecular 3. Sanidade de bovinos. I. Título.

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – o autor"

JULIANA DE OLIVEIRA NAVARRO

Detecção e caracterização moleculares de *Picobirnavirus* bovino

na região centro-sul do Brasil

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Data de aprovação: ____/ ____/ _____

Banca Examinadora:

Prof(a). Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

Aos meus pais, por todo amor, apoio e compreensão.

Agradecimentos

Agradeço...

Primeiramente a Deus, por ter me dado força para conseguir ir até o final de mais uma etapa da minha vida e pela conquista,

Aos meus pais que me apoiaram desde o primeiro momento que decidi estudar. Juntos lutaram muito para que esse sonho se tornasse realidade, assim esquecendo-se dos próprios sonhos para que os meus se realizassem,

Aos meus irmãos e sobrinho, pela compreensão, carinho e apoio nas horas difíceis,

Ao meu amigo namorado, Lucas, por toda caminhada que fizemos juntos até o momento e pelas próximas que virão, pela paciência e compreensão, por me aturar,

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, pela orientação e dedicação,

A Drª. Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz, pelas broncas que muitas vezes eram necessárias, pela amizade e pelo conhecimento transmitido,

A Profa. Dra. Maria da Gloria Buzinaro, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Jaboticabal-SP, pela concessão de amostras fecais bovinas,

Aos meus colegas de laboratório da FZEA, por ter proporcionado momentos divertidos que nunca vão ser esquecidos, e em especial ao Marcelo Candido, que me ajudou nessa conquista,

A todas as pessoas que de perto ou longe mandaram pensamentos positivos, assim ajudando a realizar este sonho, o meu muito obrigada.

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

NAVARRO, J. O. **Detecção e caracterização moleculares de *Picobirnavirus* bovinos na região centro-sul do Brasil.** 2015. 64f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Picobirnavirus (PBV) pertencem à família *Picobirnaviridae*, divididos em duas espécies *Human Picobirnavirus* e *Rabbit Picobirnavirus*. São pequenos vírus constituídos de genoma bissegmentado de cadeia dupla de RNA (dsRNA), não envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica, sendo divididos em dois genogrupos, GI e GII. Já foram detectados em fezes humanas e de uma ampla gama de espécies animais, com ou sem sinais diarreicos, sendo considerados agentes emergentes e oportunistas, e seu potencial zoonótico foi sugerido. Entretanto, os estudos epidemiológicos e moleculares de PBV em bovinos são raros na literatura nacional e internacional. Devido à carência de dados a respeito de PBV em bovinos, o presente estudo foi realizado objetivando-se a detecção e caracterização moleculares de cepas de PVB bovinos dos genogrupos GI e GII em amostras fecais de bovinos com ou sem sintomatologia diarreica de diferentes idades e regiões do Brasil. O estudo foi conduzido a partir de 77 animais, obtendo-se 18 (23,3%) amostras positivas para GI, compreendendo animais provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Goiás. Não foram detectadas amostras positivas para GII. A identidade nucleotídica das amostras obtidas apresentou média de 67,4% quando comparadas uma com as outras e de até 83,77% quando comparadas com amostras de PBV de referência. Na reconstrução filogenética, três amostras agruparam-se em clado de PVB humano e somente uma agrupou-se em clado de PVB bovino. Em síntese, os resultados obtidos indicam, de maneira inédita, a circulação de PVB bovino pertencente ao genogrupo GI em diferentes estados brasileiros, com perfis filogenéticos heterogêneos.

Palavras chave: picobirnavírus bovino, epidemiologia molecular, sanidade de bovinos.

ABSTRACT

NAVARRO, J. O. **Molecular detection and characterization of bovine *Picobirnavírus* in central-south region of Brazil**. 2015. 64f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Picobirnavirus (PBV) belong to the Picobirnaviridae family, divides into two species *Human Picobirnavirus* and *Rabbit Picobirnavirus*. They are small, non-enveloped, bisegmented double-stranded RNA (dsRNA) virus with an icosahedral capsid, being divided into two genogroups, GI and GII. They have been detected in feces of humans and many animal species, with or without diarrheal signs and are considered emerging and opportunistic agents, and its zoonotic potential has been suggested. However, epidemiological and molecular studies of bovine PBV are rare in the national and international literature. Due to lack of data on PBV in cattle, this study was conducted aiming to detect and molecularly characterize bovine PBV strains of GI and GII genogroups in feces from animals with or without diarrheal signs of different ages and regions of Brazil. Seventy-seven animals were sampled, resulting in 18 (23.3%) positive samples for GI, including animals from the states of São Paulo, Minas Gerais and Goiás. There were no positive samples for GII. The nucleotide identity of the samples obtained showed a mean of 67.4% compared to each other and up to 83.77% compared to PBV reference samples. In phylogenetic reconstruction, three samples were grouped in the human PBV clade and only one sample was clustered in the bovine PVB clade. In summary, the results indicate in an unprecedented way the circulation of the bovine PBV belong to GI genogroup in different Brazilian states, with heterogeneous phylogenetic profiles.

Keywords: bovine picobirnavirus, molecular epidemiology, bovine health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do vírion de picobirnavírus.....17

Figura 2. Representação do genoma do picobirnavírus baseado na estirpe humana Hy005102..... 19

Figura 3. Distribuição mundial de picobirnavírus.....21

Figura 4. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR®Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos para actina bovina como controle interno, a partir da técnica de RT-PCR, utilizando extração de RNA com TRIZOL®..... 39

Figura 5. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR®Gold, sob luz UV, ilustrando resultado de amplificação de fragmentos de 201bp, relativo ao gene RdRp do genoma de PBV, após aplicação das técnicas de RT-PCR, a partir de amostras fecais bovinas..... 40

Figura 6. Localização geográfica dos estados em que foram detectados PBV no presente studo.....41

Figura 7. Visão parcial (79nt) do alinhamento entre as sequências nucleotídicas das 11 amostras detectadas por RT-PCR no presente estudo, a partir das amostras fecais testadas e outras sequências de PBV conhecidas, recuperadas do GenBank, conforme a tabela 2. As amostras detectadas no presente estudo estão em destaque.....42

Figura 8. Cladograma representando reconstrução filogenética através do método *Neighbor-Joining* (NJ), utilizando-se o modelo de substituição Kimura-2-Parâmetros com suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas entre sequências genômicas de PBV do genogrupo I, relativas a produto de 201pb do gene RpRd. As sequências obtidas neste estudo estão em destaque.....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de RT-PCR para picobirnavírus bovinos e controle interno..... 28

Tabela 2. Sequências nucleotídicas de picobirnavírus utilizadas para reconstrução filogenética com indicação do genótipo, nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank..... 33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Relação dos animais amostrados positivos para picobirnavírus bovino através de RT-PCR, segundo as características investigadas.....37

Quadro 2. Comparação das porcentagens de identidade das sequências nucleotídicas para fragmento de 201bp do gene RpRd de picobirnavírus bovino, entre 11 amostras detectadas por RT-PCR no presente estudo e sequências de outros picobirnavírus (humano, peru, bovino, suíno, aviário) recuperadas do GenBank.....43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Por cento

> - Maior

≤ - Menor ou igual

ºC - Grau Celsius

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dsRNA – RNA de dupla fita

EGPA - Eletroforese em gel de poliacrilamida

GI - Genogrupo I

GII - Genogrupo II

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

ICTV - Comitê Internacional de Taxonomia Viral

Kpb - Kilo par de bases (pb × 1000)

mL – Mililitro

min - Minuto

mM - Milimolar

mg - Miligrama

$MgCl_2$ - Cloreto de magnésio

ng – nanograma

nt - nucleotídeo

ORF - Open Reading Frame

pb - Par de bases

PBV - Picobirnavírus

pH - Potencial hidrogeniônico

PCR - Reação em Cadeia pela Polimerase

RdRp - RNA polimerase dependente de RNA

RT – Transcrição Reversa

RNA - Ácido ribonucleico

TAE - Tris-Acetato/EDTA

µL - Microlitro

µg - Micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....17

1.1. CARATERÍSTICAS GERAIS DO PICOBIRNAVIRUS..... 17

1.2. EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA..... 19

1.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL..... 23

1.4. PICOBIRNAVÍRUS DE BOVINO NO BRASIL..... 24

2. OBJETIVOS.....26

3. MATERIAL E MÉTODOS.....27

3.1. COLETA DE AMOSTRAS FECAIS.....27

3.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR PICOBIRNAVÍRUS ATRAVÉS DE RT-PCR..... 27

3.2.1. PRIMERS E CONTROLE POSITIVO..... 27

3.2.2. EXTRAÇÃO DE RNA..... 28

3.2.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)..... 29

3.2.4. PCR E RECUPERAÇÃO DOS AMPLICONS..... 29

3.2.5. EXTRAÇÃO DE DNA DE GEL DE AGAROSE..... 30

3.2.6. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS..... 31

3.2.7. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS..... 32

3.2.8. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....32

3.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 33

4. RESULTADOS..... 34

4.1. COLHEITA DE AMOSTRAS FECAIS.....34

4.2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA A DETECÇÃO DE FRAGMENTO GENÔMICOS DE PICOBIRNAVIRUS BOVINO..... 34

4.3. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS..... 35

4.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA.....36

5. DISCUSSÃO.....45

6. CONCLUSÃO.....49

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....50

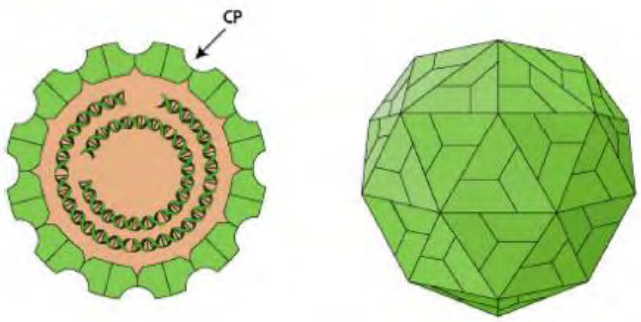
APÊNDICE.....58

ANEXO..... 66

1. INTRODUÇÃO

1.1. CARATERÍSTICAS GERAIS DO PICOBIRNAVIRUS

Picobirnavirus é o único gênero da família *Picobirnaviridae*, tendo duas espécies classificadas em 2008 pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV): *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus* (GANESH et al., 2012; TAKIUCHI et al., 2015). É um vírus de RNA segmentado de cadeia dupla (dsRNA), não envelopado, constituído por um capsídeo de simetria icosaédrica que protege os dois segmentos do dsRNA genômico (Figura 1). Já foram detectados em fezes humanas e em uma ampla gama de espécies animais, com ou sem sinais diarreicos (GANESH et al., 2014; GANESH et al., 2011).



Fonte: GANESH et al.,2014.

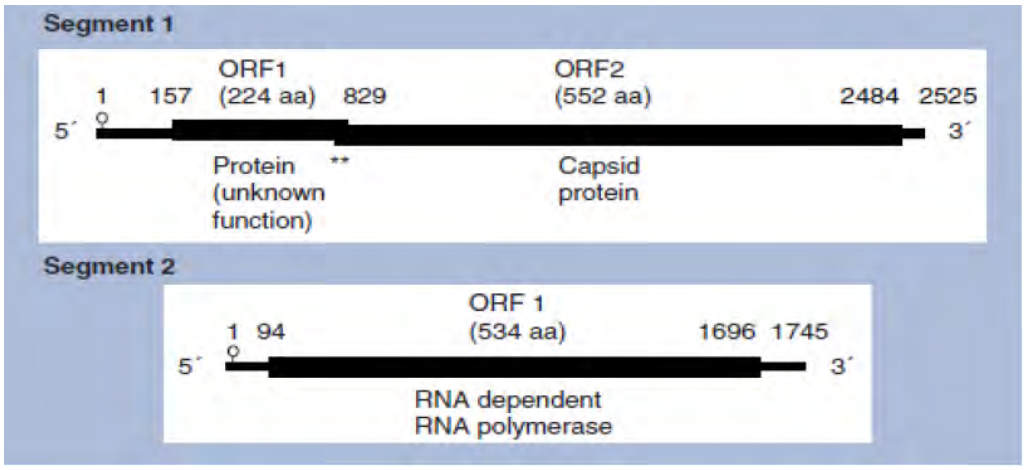
Figura 1. Representação esquemática do vírion de picobirnavírus.

O nome do picobirnavírus (PBV) foi proposto baseando-se nas suas características. O prefixo “pico” denota o pequeno diâmetro da partícula viral (35nm) e “birna” refere-se ao genoma que é constituído por dois segmentos, que variam em tamanho desde 2.4 a 2.6 Kbp, perfil longo, e 1.5 a 1.8 Kbp, perfil curto. (MONDAL & MAJEE, 2014). O tamanho dos segmentos genômicos tem sido estimado utilizando-se como referência o perfil de migração

eletroforética do genoma de estripes de rotavírus padrão em eletroforese em gel de poliacrilamida (PERERIRA et al., 1988).

A caracterização molecular das estirpes humanas e animais revelou que PBV são altamente variáveis, reconhecendo assim dois genogrupos, Genogrupo I (GI) e Genogrupo II (GII), que foram baseados em diferentes sequências genômicas do segmento 2 (MONDAL & MAJEE, 2014; MALIK et al., 2014; SILVA et al., 2014). A identidade entre o GI e o GII é de aproximadamente 37 a 40% para nucleotídeos e 17 a 28% para a sequência de aminoácidos (BÁYAI et al., 2003). Notavelmente, até a presente data, 805 sequências de PBV de ambos os segmentos 1 e 2 estão disponíveis no Centro de Informação sobre Biotecnologia (NCBI), 83,11% são do genogrupo I e 2,52% são do genoprupo II.

A organização genômica deste vírus é baseada na amostra de PBV humano (Hy005102), originária da Tailândia. Esta era a única sequência de genoma PBV completo conhecido até 2012 quando Woo et al. (2012) relataram o genoma completo de PBV detectado em fezes de leão marinho. Na estirpe humana Hy005102, o segmento 1, também conhecido como segmento longo, possui 2.525 pb e duas fases de leitura, ORF1 e ORF2, responsáveis pela expressão de uma proteína ainda desconhecida e a proteína do capsídeo, respectivamente. O segmento 2, chamado de seguimento menor possui 1745 pb e contem uma fase de leitura (ORF1) que codifica um peptídeo de 534 aminoácidos, uma RNA polimerase viral dependente de RNA (RdRp), conforme demonstrado na figura 2 (NATES et al., 2011).



Fonte: NATES *et al.*, 2011.

Figura 2. Representação do genoma de picobirnavírus baseado na estirpe humana Hy005102.

A circulação de PBV é bem heterogênea, sendo que as estirpes circulantes apresentam uma variedade de identidade de nucleotídeos e aminoácidos de 60 a 87% e 64 a 90%, respectivamente. Entretanto, a relevância biológica ou clínica relacionadas aos dois genoprupos ainda são desconhecidas (BHATTACHARYA et al., 2007; VAN LEEUWEN et al.,2010).

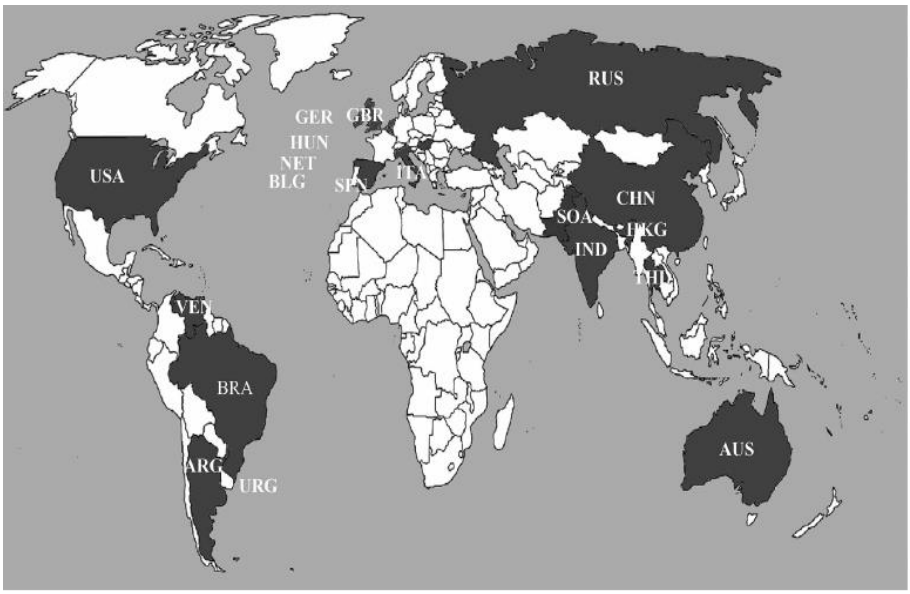
1.2. EPIDEMIOLOGIA E PATOGENIA

A primeira descrição de PBV foi através de amostra de fezes de criança utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), relatado por Pereira et al. (1988a). A partir desse relato, diversos estudos descreveram a presença desses vírus em diferentes espécies de mamíferos: ratos (PEREIRA et al., 1988b; FREGOLENTE et al., 2009), bovinos (VANOPDENBOSCH & WELLEMANS, 1989; GHOSH et al., 2009; BUZINARO et al., 2003; MALIK et al., 2011), búfalos (MONDAL et al., 2013; MALIK et al., 2011), suínos (GATTI et al., 1989; LUDERT et al., 1991; PONGSUWANNA et al., 1996; BÁNYAI et al., 2008), cavalos (BROWNING et al., 1991), coelhos (GALLIMORE et al., 1993; LUDERT et al., 1995), tamanduá bandeira (HAGA et

al.,1999), jumento, orangotango e tatu (MASACHESSI et al., 2007), macacos (WANG et al., 2012), leão (WOO et al., 2012; GILLMAN et al., 2013), puma, jaguar e gato (GILLMAN et al., 2013). Em aves, PBV já foi detectado em galinhas (LEITE et al., 1990; SILVIA et al., 2014), frangos de corte (TAMEHIRO et al., 2003), gansos (MASACHESSI et al., 2007), ema, pelicano e faisão (MASACHESSI et al., 2007); em répteis, PBV já foi encontrado em diferentes espécies de cobras (MASACHESSI et al., 2007).

Recentes estudos de monitoramento ambiental realizados nos EUA e Alemanha detectaram PBV em altas frequências no esgoto comum (efluente final após tratamentos de águas residuais e de amostras de águas superfícies naturais). PBVs do genogrupo I foram detectados em 12/12 (100%) do esgoto e 4/12 (33%) de efluentes de águas residuais finais em instalações de tratamento em áreas costeiras metropolitanas dos Estados Unidos da América, nos estados de Alabama, Califórnia, Connecticut, Louisiana, Maine, Maryland, Nova Jersey, North Carolina, Oregon e Washington (HAMZA et al., 2011; Symonds et al., 2009).

Desde a sua descoberta no ano de 1988 até janeiro de 2014, vários países têm relatado PBV (Figura 3): Estados Unidos da América, Argentina, Bélgica, Brasil, Venezuela, Itália, Alemanha, Hungria, Rússia, China, Índia, Tailândia, Austrália, Holanda, Uruguai, Hong Kong, Espanha, Grã-Bretanha, Irlanda e Sul da Ásia (GANESH et al., 2014). Dados publicados sobre a prevalência do vírus em diversos países indicam uma frequência bastante variável: na Venezuela, de 2,14% (LUDERT & LIPRANDI, 1993); no Brasil, de 0,45% (PEREIRA et al., 1988a); na Itália, de 0,42% (CASCIO et al., 1996) e na Argentina, de 0,09% (GIORDANO et al., 2008).



Fonte: Adaptado de GANESH et al., 2014.

Figura 3. Distribuição mundial de picobirnavírus. Países que têm relatado PBV estão indicados em cor escura com base em publicações de 1998 a dezembro de 2015.

A excreção de PBV nas fezes de humanos tem sido relatada tanto em indivíduos com diarreia como também em hospedeiros assintomáticos. Embora alguns estudos epidemiológicos tenham relatado a presença do vírus em amostras fecais de adultos e crianças com diarreia, a relação etiológica do PBV com a síndrome diarreica ainda não pode ser estabelecida, atribuindo-se essa relação inconclusiva a escassez de estudos epidemiológicos controlados (GANESH et al., 2010). A falta de um padrão consistente para a detecção do PBV concomitantemente em indivíduos saudáveis e com diarreia levanta questões sobre o potencial patogênico do PBV, embora tenham sido frequentemente implicados em infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos (GANESH et al., 2011).

Frequência significativa em pacientes imunocomprometidos foi observada, quando comparados ao grupo controle, variando entre 10 a 13% de presença de PBV em amostras de fezes coletadas de pacientes adultos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e com quadro clinico de diarreia (GROHMANN et al., 1993; GIORDANO et al., 1998; GONZALEZ et al., 1998; GIORDANO et al., 1999).

A detecção do PBV em coinfecção já foi relatada em casos de diarreia, juntamente com o rotavírus, astrovírus, calicivírus, *Escherichia coli* e *Salmonella*, dificultando a interpretação de que o PBV seja o agente etiológico primário. Entretanto, em um estudo holandês que analisou 84 amostras fecais de pacientes humanos com diarreia de etiologia desconhecida (fezes previamente triadas como negativas para os principais enteropatógenos), o PBV foi detectado como patógeno singular em 21% das amostras (VAN LEEUWEN et al., 2010).

Por outro lado, no Reino Unido, foram encontradas taxas de excreção de PBV muito próximas; 9 e 13% em pacientes com diarreia e sem diarreia, respectivamente (GALLIMORE et al., 1995). Desta forma, a participação deste vírus como agente etiológico primário da diarreia em humanos não está totalmente esclarecida e a possibilidade de que possa atuar como um patógeno secundário oportunista ou um vírus inócuo do trato intestinal tem sido sugerida (NATES, GATTI e LUDERT, 2011).

Entre os animais, vários estudos de prevalência de PBV já foram realizados. O primeiro relato em animais foi na espécie suína: em 912 amostras de fezes suínas analisadas no Brasil, o PBV foi detectado em 15,3% das amostras diarreicas e 9,6% em fezes não diarreicas (GATTI et al., 1989), sugerindo que PBV seria um novo agente causador de diarreia na espécie suína. Por outro lado, Ludert et al. (1991) detectaram o vírus em frequência semelhante entre os suínos com e sem diarreia em fazendas na Venezuela. Takiuchi et al. (2015) obtiveram a primeira sequência nucleotídica de PBV a partir de bovinos no Brasil: em 289 amostras de fezes de bezerros, 24 (8,3%) foram positivas pela técnica de PAGE, sendo que 15 dessas positivas pelo PAGE (62,5%) também o foram pela reação de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR).

Apesar dos numerosos relatos da presença de PBV em amostras fecais, a partir de várias espécies animais, os resultados são controversos e não permitem concluir sobre a relação etiológica do PBV e a síndrome diarreica. Em estudos conduzidos em humanos, os resultados também são contraditórios (FREGOLENTE et al., 2009; GANESH et al., 2012)

A detecção de PBV nas fezes de mamíferos diarreicos, numa grande variedade de aves selvagens e também em animais de zoológico aumenta a

preocupação em relação à saúde pública, devido aos aspectos de transmissão e de circulação destes vírus representarem uma ameaça zoonótica, uma vez que o hospedeiro natural ou espécies que servem como reservatório natural do vírus permanecem indefinidos (GANESH et al., 2014).

1.3. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Ainda não foram estabelecidas linhagens celulares para isolamento ou modelos animais para amplificação do PBV em laboratório (GANESH et al., 2014), e até o momento nenhum teste imunológico para detecção e/ou caracterização do PBV esta disponível; sendo assim, os testes moleculares (PAGE e RT-PCR) são os únicos disponíveis e utilizados rotineiramente para detecção de PBV, contribuindo de forma notável também para o diagnóstico de outras enfermidades infecciosas (FREGOLENTE et al., 2009).

Para vírus com genoma segmentado, tais como os rotavírus (11 segmentos) e o PBV (2 segmentos), o PAGE é uma técnica barata e fácil de ser aplicada, podendo ser utilizada com eficiência para a detecção dos segmentos genômicos bem como para a caracterização do eletroferogrupo destes vírus (PEREIRA et al., 1988a). O PAGE é considerada a técnica padrão ouro para a o diagnóstico do PBV; essa técnica consiste na separação dos dois segmentos dos PBVs, através do tamanho molecular dos mesmos em gel de poliacrilamida. A distância de migração de cada segmento de RNA viral na eletroforese é inversamente proporcional ao tamanho molecular do mesmo. Estes segmentos podem ser visualizados por coloração com nitrato de prata (NATES, GATTI e LUDERT, 2011; SOUZA, 2011).

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica de amplificação de ácidos nucléicos que possui uma alta sensibilidade e especificidade e que permite a detecção e identificação de quantidades mínimas do material genético do agente suspeito. Pode ser utilizada para detectar DNA e RNA virais, desde que se conheça alguma sequência do seu genoma (FLORES, 2007). Para a detecção de vírus de RNA é utilizada a RT- PCR (reação de

transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase) que usa como molde uma sequência de RNA para sintetizar um DNA complementar (cDNA), e a partir desse cDNA realiza-se a PCR para amplificação do fragmento de interesse (BURTIS et al., 2006).

A identificação do PBV nas amostras de fezes variam amplamente, sendo principalmente influenciada pelos métodos laboratoriais escolhidos para a detecção. Devido à alta diversidade genômica das estirpes, muitas vezes os pares de primers utilizados podem falhar na amplificação de fragmentos de algumas amostras que são claramente positivas pelo PAGE, gerando resultados falsos-negativos ao RT-PCR. Desta forma, embora o PAGE apresente uma sensibilidade inferior à RT-PCR, permanece como uma técnica válida e útil para a detecção de PBV por ser a única capaz de detectar todas as estirpes variantes. Por outro lado, a RT-PCR possui uma grande vantagem pela geração de fragmentos que podem ser sequenciados posteriormente, permitindo-se a realização de estudos evolutivos e de polimorfismos, contribuindo assim para melhor elucidação da epidemiologia das infecções causadas por PBV (NATES et al., 2011).

1.4. PICOBIRNAVÍRUS EM BOVINO NO BRASIL

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil é dono do segundo maior rebanho efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, ficando apenas atrás da Índia. Além disso, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (BRASIL, 2014)

Vista como uma das principais enfermidades que acometem bezerros neonatos, a diarreia gera mundialmente perdas econômicas na pecuária bovina, as gastroenterites acometendo bovinos podem estar relacionadas a diversos enteropatógenos, a severidade eventualmente depende do agente causador podendo ser bacteriano, fúngico, viral, protozoário ou helmíntico

(VIRTALA et al., 1996; BARRINGTON et al., 2002; KANEENE & HURD, 1990; (RADOSTITS et al., 2000).

Em relação à ocorrência viral de picobirnavírus em bovinos e estudos epidemiológicos e moleculares são raros na literatura nacional e internacional, ao contrário das pesquisas em hospedeiros humanos e suínos (TAKIUCHI et al., 2015).

A primeira detecção do PBV associado à diarreia em bovinos foi feita em 1989 por Vanopdenbosch e Wellemans. Em 2003, Buzinaro e colaboradores fizeram a primeira detecção do PVB no Brasil. Nesse estudo, foram analisadas 576 amostras fecais de bezerros com idade entre 1 e 45 dias com e sem sintomatologia de diarreia, criados em 63 fazendas de gado leiteiro no estado de São Paulo. Das amostras analisadas, 0,68% (4/576) foram positivas para PVB.

Depois deste, apenas três outros estudos foram realizados para a detecção de PBV em bovinos ao redor do mundo. Malik et al. (2011) relataram uma positividade de 3,7% (5/136) nas amostras analisadas. Mondal et al. (2013) avaliaram 113 amostras de fezes obtidas a partir de búfalos e bovinos diarreicos; desse total, 3,53% (4/113) foram positivas para PBV. Estes dois estudos foram realizados na Índia utilizando-se a técnica de PAGE, tendo apresentado resultados semelhantes. Takiuchi et al. (2015) analisaram 289 amostras de fezes de bezerros pela técnica de PAGE detectando 8,3% (24/289) de positivos para PBV; a partir dessas amostras positivas, realizou-se a técnica de RT-PCR, sendo que das 24 amostras positivas somente 15 (62,5%) apresentaram positividade neste método. Tal estudo foi realizado com animais oriundos do estado do Paraná, Brasil.

Em termos de caracterização genômica, o número de sequências nucleotídicas de PVB depositadas em bancos de dados ainda permanece limitado, não ultrapassando 13 no GenBank, incluindo uma oriunda de bovino do Brasil (TAKIUCHI et al., 2015), sendo que apenas uma é pertencente ao genótipo II, oriunda de espécime da Índia (Picobirnavirus GII/PBV/Bovine/India/HP/2012 H7).

2. OBJETIVOS

Nesse contexto, tendo-se em vista a necessidade de estudos envolvendo a possível circulação de picobirnavírus bovino em rebanhos leiteiros e de corte da região centro-sul e norte do Brasil, enfocando-se o diagnóstico laboratorial, através de técnicas moleculares, empreendeu-se o presente estudo que teve como objetivos:

1. Detecção de sequências genômicas específicas de PBV, relativas ao gene da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), a partir de amostras oriundas de banco de amostras clínicas fecais de bovinos de vários estados do país;

2. Caracterizar as sequências nucleotídicas obtidas através de análise filogenética;

3. Verificar a correlação entre as amostras positivas para o diagnóstico molecular com sinais clínicos de diarreia.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COLETA DE AMOSTRAS FECAIS

As amostras utilizadas no presente trabalho, totalizando 77, são provenientes de banco de amostras fecais, coletadas conforme recomendam HOET et al. (2003), pertencente ao Laboratório de Higiene Zootécnica do Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP). O referido banco é composto por 77 amostras fecais de bovinos diarreicos e sadios, colhidas de rebanhos leiteiros e de corte de diferentes municípios dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rondônia, Paraná e Rio Grande do Sul. Estas amostras são provenientes de animais classificados quanto ao sexo, raça, idade e aptidão, e distribuídas em três categorias: bezerros (≤ 6 meses), jovens (≤ 2 anos) e adultos (> 2 anos). Tais amostras foram coletadas diretamente do reto, acondicionadas em sacos plásticos individuais e mantidas sob refrigeração (banho de gelo) até o laboratório, onde foram diluídas a 1:10 em meio essencial mínimo, pH 7,4, acrescido de 1% de bicarbonato de sódio e 1% de mistura de antibióticos (penicilina e estreptomicina); em seguida, as suspensões foram submetidas a vórtex por 30 segundos e centrifugadas (8000 × *g*, 20 min, 4ºC); os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a –80°C até o momento do uso. Os procedimentos de coleta das amostras foram realizados sob autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da FZEA-USP, de acordo com o protocolo nº 13.1.543.74.2. (ANEXO)

3.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR PICOBIRNAVÍRUS ATRAVÉS DE RT-PCR

3.2.1. PRIMERS E CONTROLE INTERNO

Os primers foram selecionados para a amplificação de fragmento genômico do gene RdRp de PBV, através da técnica de RT-PCR de acordo com as recomendações de ROSEN et al. (2000), utilizando-se amplificação de

produto do gene da actina bovina (RENSHAW et al., 2000) como controle interno. As sequências dos primers utilizados, os respectivos tamanhos dos produtos amplificados, bem como os genes alvos correspondentes estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações de RT-PCR para picobirnavírus de bovinos e controle interno.

Nome	Orientação	Sequência (5' -3')	Gene	Genogrupo	Produto (pb)
PicoB25	senso	TGGTGTGGATGTTTC	RdRp	Genogrupo I	201
PicoB43	antissenso	A(GA)TG(CT)TGGTCGAACT T	RdRp	Genogrupo I	
PicoB23	senso	CGG TATGGATGTTTC	RdRp	Genogrupo II	369
PicoB24	antissenso	AAG CGA GCCCATGTA	RdRp	Genogrupo II	
Actin-F	senso	ACCAGCCATCCAGACAAAAC	Actina	---	360
Actin-R	antissenso	ATCTTCAGGGACTTTGGACG	Actina	---	

Fonte: RENSHAW et al., 2000; ROSEN et al., 2000.

3.2.2. EXTRAÇÃO DE RNA

Alíquotas de 300 µL de suspensões fecais, conforme descrito no item 3.1, foram submetidas à extração de RNA, utilizando-se o método do TRIzol™ (Life Technologies, EUA), após prévio descongelamento, conforme as recomendações do fabricante. Ao final do respectivo protocolo de execução, realizou-se a quantificação em micrograma/mililitro (µg/mL) do RNA obtido para cada amostra por espectrofotometria (DS-11/DS-11+ Spectrophotometer, DeNovix, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280}, com a finalidade de se determinar o volume de cada amostra de RNA a ser submetido à reação de transcrição reversa (RT), a fim de se evitar quantidades maiores do que 1,0 µg de RNA por amostra, conforme indicação de kit comercial descrito no item 3.2.3, limite adotado para todas as reações realizadas.

3.2.3. TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT)

Para a reação de transcrição reversa, foi utilizado o kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Em linhas gerais, em microtubo livre de nucleases, foram adicionados 4,0 µL de cada amostra de RNA extraído e 1,0 µL de *random* primer e do primer Actin-F para as reações de RT-PCR a 10 micromolar (µM). Logo após, os microtubos foram aquecidos a 70°C, por 5 min, e, em seguida, foram resfriados em gelo por 5 min para permitir o anelamento dos primers com o RNA. Na sequência, foram adicionados 3,2 µL de água livre de nucleases, 4 µL do tampão ImProm-II™ 5X Reaction Buffer, 4,8 µL de cloreto de magnésio ($MgCl_2$), 1 µL de conjunto de nucleotídeos (dNTP Mix), 1 µL de Recombinant RNasin®Ribonuclease Inhibitor e 1 µL de enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase. A mistura, totalizando 20 µL, foi homogeneizada e incubada em termociclador, seguindo um protocolo consistindo de 25ºC por 5 min, 42ºC por 60 min e 70ºC por 15 min. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases. O ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) sintetizado foi diretamente utilizado nas reações de PCR ou congelado a -80°C até o momento do uso.

3.2.4. PCR E RECUPERAÇÃO DOS AMPLICONS

Para as reações de PCR, foi utilizado o kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Em síntese, 3 µL do produto da transcrição reversa (cDNA) foram misturados com 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2X, 1,0 µL do primer senso específico (PicoB25 ou PicoB23 ou Actin-F) a 10 µM, 1,0 µL do primer antissenso específico (PicoB43 ou PicoB24 ou Actin-R) a 10 µM e 7,5 µL de água livre de nucleases (GE Healthcare, EUA) totalizando 25 µL. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), visando à amplificação de fragmento genômico de PBV, compreendeu: incubação a 94°C por 2 min., e, em seguida,

40 ciclos de 94°C por 1 min., 49°C por 2 min. e 72°C por 1 minuto, sendo a extensão final dada a 72°C por 3 minutos, consoante recomendam ROSEN et al. (2000). Para as reações de amplificação do fragmento do gene da actina bovina, o protocolo seguiu a seguinte sequência: incubação a 94°C por 3 min., e, em seguida, 35 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 min. e 72°C por 2 minutos, sendo a extensão final dada a 72°C por 10 minutos (RENSHAW et al., 2000).

Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-Acetato/EDTA (TAE 1X), num volume de 8 µL por amostra, adicionado de um volume de 2 µL de uma solução contendo 10 mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,3% (w/v) de azul de bromofenol e 65% (p/v) de sacarose, pH=7,5, (BlueJuice® Gel Loading Buffer, Life Technologies, EUA). Na sequência, o gel foi submetido à coloração em solução de SYBR® Gold nucleic acid gel stain (Life Technologies, EUA). Em seguida, o gel foi observado à luz ultravioleta, utilizando-se sistema de fotodocumentação L-Pix ST e software L-Pix Image (Loccus Biotecnologia, Brasil). O tamanho dos amplicons foi determinado pela comparação do padrão de migração eletroforética de um marcador de peso molecular de 100 pb (GE Healthcare, EUA).

3.2.5. EXTRAÇÃO DE DNA DE GEL DE AGAROSE

Para as amostras positivas ao RT-PCR, foi realizada a extração dos fragmentos de DNA dos géis de agarose, após reamplificação pelo PCR anteriormente descrito (item 3.2.4), utilizando o kit illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O procedimento de extração de DNA envolveu a excisão do fragmento do gel de agarose, por meio de lâmina de vidro estéril, sendo acondicionado em microtubo estéril. Em seguida, o fragmento excisado foi pesado em balança analítica, uma vez que, de acordo com o protocolo, para cada 100 mg do gel de agarose são acrescentados 100µL de Buffer NT tipo 3, primeiro reagente utilizado no protocolo de extração. Uma vez adicionado o tampão NT, as amostras foram incubadas à temperatura de 60°C por 15 a 30 minutos, sendo submetidas à homogeneização em vórtex a cada 2-3 minutos

até a completa dissolução do fragmento de gel. Na sequência, a amostra foi aplicada em coluna com membrana de sílica do illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, apoiada em tubo coletor, incubada por 1 minuto à temperatura ambiente e submetida à centrifugação por 30 segundos a 11.000 × *g*, à temperatura ambiente, descartando-se o conteúdo que passou pelo filtro e colocando-se a coluna novamente no tubo coletor. Procedeu-se então a lavagem da membrana de sílica; para tanto, foram adicionados 500µL de Wash Buffer tipo 1 na coluna, submetendo-a à centrifugação a 11.000 × *g* durante 30 segundos; novamente o eluato foi descartado e a coluna colocada no tubo coletor. A secagem da membrana de sílica foi realizada através da centrifugação a 11.000 × *g* durante 30 segundos, a fim de se remover o tampão Wash Buffer tipo 1 completamente.

Por fim, o DNA foi eluído com 18 µL do tampão Elution Buffer tipo 6 em microtubo estéril de 1,5 mL, deixando-se, inicialmente, a coluna em repouso, após a adição do eluente, à temperatura ambiente por 1 minuto, sendo, na sequência, submetida à centrifugação por 11.000 × *g*, durante 1 minuto, à temperatura ambiente. O DNA obtido para cada amostra através do procedimento de extração de DNA de géis de agarose foi devidamente quantificado em nanograma/microlitro (ng/µL) por espectrofotometria (DS-11/DS-11+ Spectrophotometer, DeNovix, EUA), segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280}, com o intuito de atender a concentração de DNA necessária (15 ng/µl) se determinar a quantidade de DNA, para a realização do sequenciamento dos fragmentos genômicos obtidos.

3.2.6. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS

A reação de sequenciamento foi realizada com a utilização do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA), contendo AmpliTaq DNA Polymerase, de acordo com as especificações do fabricante, e dos primers senso e antissenso. As reações foram preparadas em microplaca de 96 cavidades (MicroAmp® Optical 96 wells, Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) e o sequenciamento foi realizado

num sequenciador automático Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) pelo Setor de Sequenciamento de DNA do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo (IB-USP).

3.2.7. ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

A busca de similaridade das sequências-consenso geradas com o programa CAP3 Contig (HUANG & MADAN, 1999) e editadas com o programa BioEdit 7.0.9 (HALL et al., 1999) foi realizada pelo programa BLAST versão 2.0 (ALTSCHUL et al., 1997). A edição e alinhamento múltiplo das sequências nucleotídicas obtidas, juntamente com outras depositadas no GenBank (tabela 2), foram realizados com o programa ClustalW versão 1.4 (THOMPSON et al., 1994), implementado no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.9 (HALL et al., 1999), utilizando-se, para tanto, dos parâmetros em ‘default’.

3.2.8. ANÁLISE FILOGENÉTICA

Reconstruções filogenéticas para sequências de 201 nucleotídeos, relativas ao gene RdRp, foram realizadas através do método Neighbor-Joining (NJ), utilizando-se o modelo de substituição Kimura-2-Parâmetros com suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas através do programa MEGA 5.0 (KUMAR et al., 1994). Para as reconstruções foram utilizadas outras sequências de picobirnavírus depositadas no GenBank, conforme indicado na tabela 2.

Tabela 2. Sequências nucleotídicas de picobirnavírus utilizadas para reconstrução filogenética com indicação das suas variantes, nome, origem e respectivos números de acesso no GenBank.

Variantes	Nome	Origem	Nº acesso GenBank
AvPBV	AVE_108	Brasil	KC865829
AvPBV	AVE_104	Brasil	KC865826
PigPBV	CHH-B4	China	KC846783
BovinePBV	PVB18_PR	Brasil	KP843617
TurkeyPBV	MD - 2010	Estados Unidos	HM803965
BovinePBV	PTN P_2	Índia	JX310440
BovinePBV	PTN P120	Índia	JX310441
PigPBV	CHHN – B13	China	KC846792
AvPBV	AVE 61v1	Brasil	KC865807
AvPBV	AVE 57v1	Brasil	KC865804
HPBV	GPBV 12	Índia	AB517739
HPBV	Park – HPBV - 2	Estados Unidos	GQ915029
HPBV	GPBV10	Índia	AB517736
PigPBV	CHHN – B18	China	KC846797
HPBV	GPBV6C2	Índia	AB517732
BovinePBV	RUB - P	Brasil	GQ221268

3.2.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para analisar a associação entre os resultados de RT-PCR e quadro clínico dos animais amostrados, através do programa STATISTICA v.10 (StatSoft, Inc., USA).

4. RESULTADOS

4.1. COLETA DE AMOSTRAS FECAIS

No total, 77 amostras fecais provenientes de rebanhos leiteiros e de corte foram processadas, 35 eram do estado de São Paulo, 36 de Minas Gerais, 3 de Mato Grosso do Sul, 2 de Goiás e 1 do Rio Grande do Sul. O apêndice (Quadro 3) apresenta o banco de dados dos 77 animais utilizados neste estudo, com os dados de idade, raça, sexo, aptidão, sistema de criação, propriedade de origem, município e ocorrência ou não de diarreia.

Do total de animais amostrados, 53 (68,8%) eram bezerros (≤ 6 meses), 20 (25,9%) eram jovens (≤ 2 anos) e 4 (5,2%) eram adultos (> 2 anos). Os bovinos apresentando aptidão para leite totalizaram 63 animais (81,8%), enquanto que 14 (18,9%) eram provenientes de rebanhos para corte. Mestiços totalizaram 24 (31,5%) bovinos, enquanto 53 animais (68,8%) pertenciam à raça holandesa. Os machos perfizeram 21 animais (27,3%), enquanto que 56 (72,7%) fêmeas foram amostradas. Animais criados em regime extensivo de produção totalizaram 14 bovinos (18,2%), enquanto que o restante 63 animais (81,8%) estavam sob sistema semi-intensivo. Em relação à ocorrência ou não de diarreia, 31 animais (40,3%) apresentavam quadro diarreico, sendo que todos se enquadravam na categoria de bezerros, ou seja, possuíam ≤ 6 meses de vida.

4.2. APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA A DETECÇÃO DE FRAGMENTOS GENÔMICOS DE PICOBIRNAVIRUS DE BOVINO

Do total de 77 amostras fecais, 18 animais foram considerados positivos ao RT-PCR para PBV pertencente ao GI, com a amplificação de fragmento do gene RdRp de tamanho esperado (201pb) (Figura 5), perfazendo no total uma positividade de 23,8% (18/77) entre os animais (Quadro 1). As mesmas 77 amostras foram processadas para o GII de picobirnavírus, entretanto nenhum produto de tamanho esperado foi obtido, sendo, portanto, consideradas

negativas para esse genogrupo. A figura 4 ilustra a amplificação de fragmentos específicos para o gene da actina bovina, utilizada como controle interno.

Do total de amostras positivas, 11 eram originárias de bezerros (61,1%) e 7 de animais jovens (38,9%). Quanto ao sexo, a maior parte dos animais eram fêmeas (n=14, 77,8%) e 4 (22,2%) eram machos. Treze animais (72,2%) não apresentavam quadro de diarreia, enquanto cinco (27,8%) apresentavam, embora sem associação estatisticamente significante com os resultados do RT-PCR (P>0,05), dentro do total de amostras testadas (n=77). Todos apresentavam aptidão leiteira (94,5%), exceto 1 (5,5%) de aptidão para corte.

As amostras positivas para PBV bovino seguiram a seguinte distribuição: 13 amostras (72,3%) oriundas do estado de São Paulo, 4 amostras (22,2%) do estado de Minas Gerais e 1 amostra (5,5%) do estado de Goiás (Figura 6).

4.3. SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS

Do total de 18 amostras positivas para o GI através de RT-PCR, 11 amostras puderam ser submetidas ao sequenciamento nucleotídico, dada a adequada concentração de DNA apresentada pelas mesmas (mínimo necessário para a realização do sequenciamento: 15 ng/µL, segundo a razão de absorbância A_{260}/A_{280}). E estas amostras foram submetidas à análise filogenética (figura 7).

Das 11 amostras de PBV sequenciadas, 8 amostras eram provenientes do estado de São Paulo (números de cadastro das amostras: 6, 19, 20, 21, 24, 75, 164 e 283), 3 de Minas Gerais (número de cadastro: 115, 246) e 1 de Goiás (número de cadastro: 188).

A maior porcentagem de identidade de nucleotídeos obtida entre as amostras de PBV sequenciadas foi de 87,76%, sendo a menor porcentagem de 53,28%, quando comparadas umas com as outras. Com relação às amostras de referência de PBV, recuperadas do GenBank, as amostras obtidas no presente trabalho apresentaram uma identidade que variou entre 51,52 a 83,77%. A amostra 20-Pedregulho/SP, oriunda do animal de cadastro nº 20

(Apêndice – Quadro 3), apresentou maior identidade com a seqüência HPBV, detectado em humanos na Índia.

O quadro 2 elenca as porcentagens de identidade das sequências de nucleotídeos entre 11 amostras sequenciadas e submetidas à análise filogenética e sequências de referência para picobirnavírus recuperadas do GenBank.

4.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA

A figura 8 ilustra o cladograma obtido da reconstrução filogenética de nucleotídeos para as sequências de picobirnavírus. Em linhas gerais, as amostras 21-Pedregulho/SP, 20-Pedregulho/SP, 164-Jaboticabal/SP agruparam-se no mesmo clado de amostras de picobirnavírus humano, o mesmo aconteceu com a amostra 6-Pedregulho/SP apresentando um valor de *bootstrap* de 42%. Entretanto, a amostra 75-Jaboticabal/SP agrupou-se em clado abrangendo picobirnavírus de suíno com um valor de *bootstrap* de 65%. Somente a amostra 283-Lins/SP agrupou-se em clado de picobirnavírus bovino apresentando um valor de *bootstrap* de 40%.

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
6	Macho da Dengosa	2 meses	M	idem	idem	Pedregulho-SP	03/07/07		X
17	Macho da Garça	5 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
19	278 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
20	279 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
21	268 vacinada	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
24	282 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
25	276 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
75	1352	2 meses e 26 dias	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema intensivo (vacas e bezerras) e semi-intensivo (novilhas)	idem	idem		X
77	1354	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
108	742	7 meses	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema intensivo (vacas e bezerras); Sistema semi-intensivo (novilhas)	Machado-MG	07/12/07		X

Quadro 1 - Relação dos animais amostrados positivos para picobirnavírus bovino através de RT-PCR, segundo as características investigadas.

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
113	734	8,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
115	736	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
164	77/08	46-60 dias	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistemas intensivo e semi-intensivo	Jaboticabal-SP	03/09	X	
166	79/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
188	285/08	16-20 dias	M	Corte	Angus (Sistema extensivo)	Serranópolis-GO	04/09	X	
246	S61	60 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010		X
263	526	45 dias	M	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010	X	
283	688	15 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Lins/SP	18/07/2010	X	

M= masculino, F= feminino, I= idem

Quadro 1 - Relação dos animais amostrados positivos para picobirnavirus bovino através de RT-PCR, segundo as características investigadas.

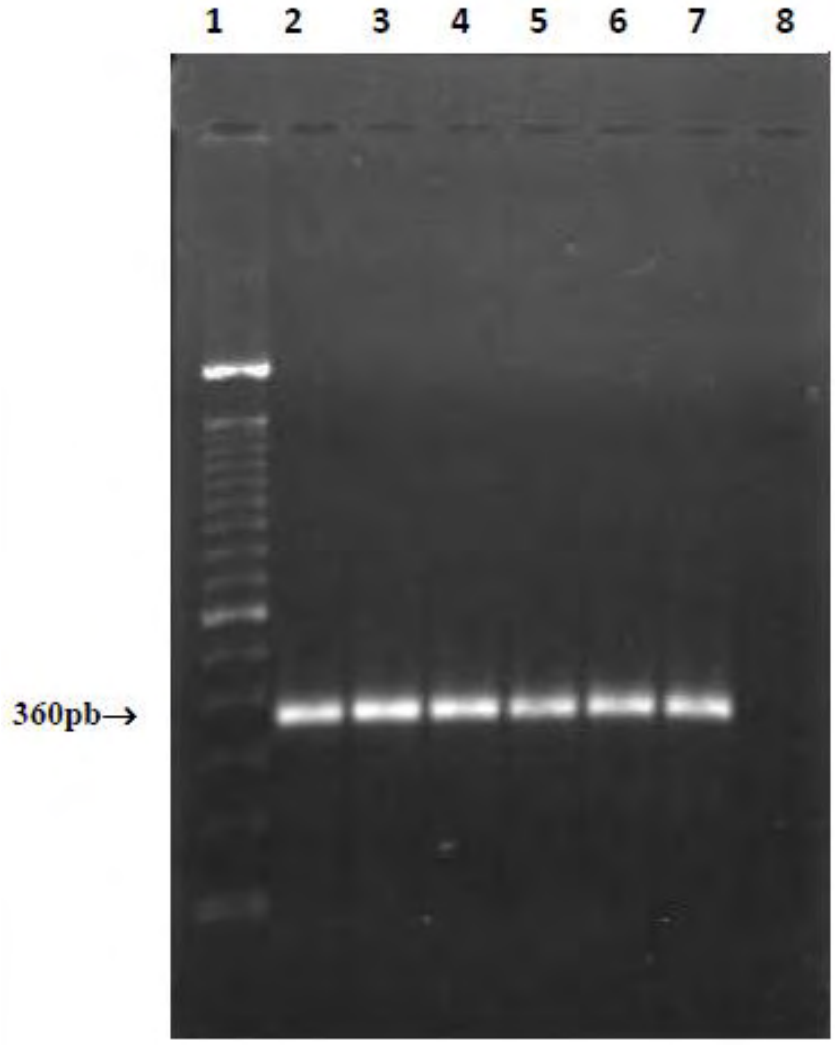


Figura 4. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR®Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos para actina bovina como controle interno, a partir da técnica de RT-PCR, utilizando extração de RNA com TRIZOL®. As amostras fecais de bovinos foram aleatoriamente selecionadas entre as amostras testadas (1) Marcador de peso molecular de 100bp. (2) Amostra 159. (3) Amostra 170. (4) Amostra 172. (5) Amostra 205. (6) Amostra 266. (7) Amostra 213. (8) Controle negativo (água livre de nucleases).

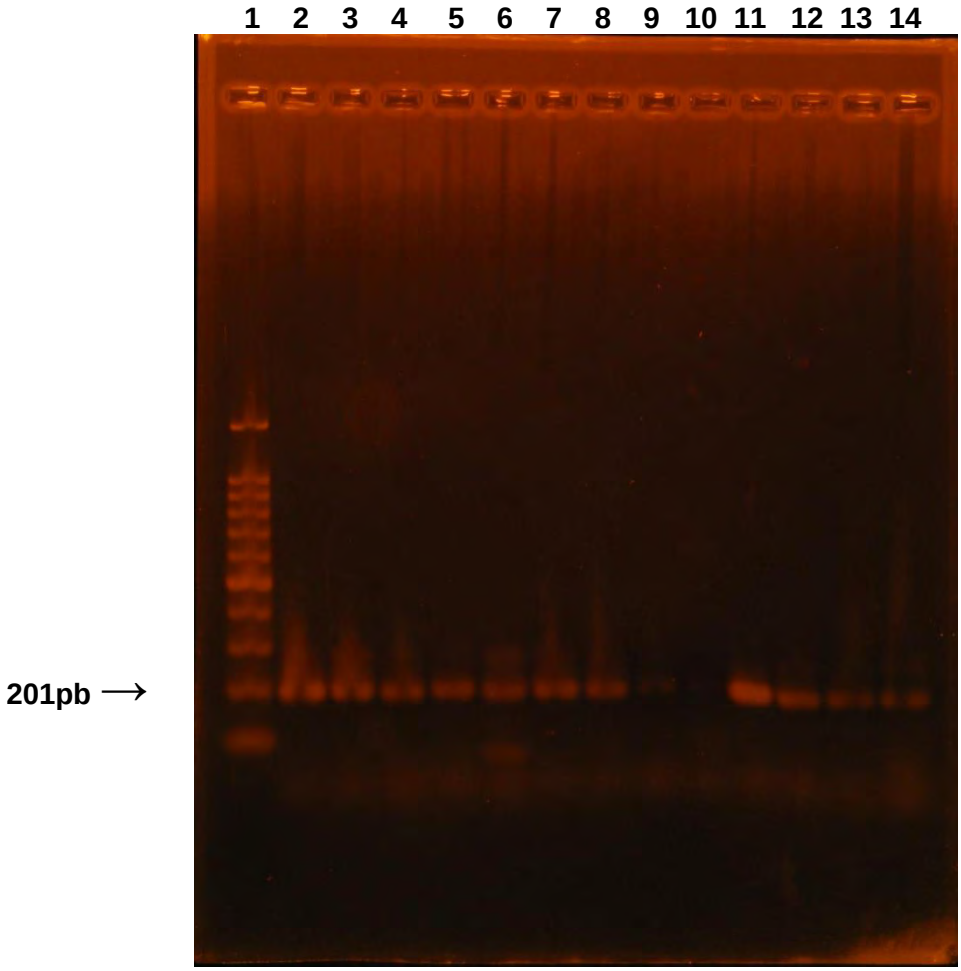


Figura 5. Fotografia de gel de agarose corado com SYBR®Gold, sob luz UV, ilustrando resultado de amplificação de fragmentos de 201bp, relativo ao gene RdRp do genoma de PBV, após aplicação das técnicas de RT-PCR, a partir de amostras fecais bovinas. (1) Marcador de peso molecular de 100bp. (2) Amostra 6. (3) Amostra 17. (4) Amostra 19. (5) Amostra 20. (6) Amostra 21. (7). Amostra 24. (8) Amostra 25. (9) Amostra 83. (10) Amostra 92. (11) Amostra 113. (12) Amostra 115. (13) Amostra 164. (14) Amostra 166.

Figura 6. Localização geográfica dos estados em que foram detectados PBV no presente estudo.

```
19-Pedregulho/SP                          CGAC-ACGATCTCGTACCTGCTTGGGTTAGCATGGACTCAGTTGATCGGAGGATCACCAAGCTCTTCGACACTAAGGAC
20-Pedregulho/SP                          GA-ACTCAATCTCGTTCCAGCTTGGGTTAGCATGGAATCGGTCGACCAGCGTATCACTCAACTGTTTGATACAAGGGT
21-Pedregulho/SP                          GAGATTCAATCTCGTTCCTGCTTGGGTTAGCATGGAATCGGTCGACCAGCGTGTCACACGTATGTTTGATACGAAGGGC
24-Pedregulho/SP                          CAG-CATGGAGTTGTTCCAGCCTGGGTTGGTCTGGAATCCGTGGATCGGAGAATCACTAAATTGTTCGATACCAAGGGC
164-Jaboticabal/SP                        GCACTTCAACTTGATTCCAGCGTGGGTTTCGATGGAATCGGTCGACCAGAGTATCACTAGACTCTTTGATACAAAGGGG
115-Machado/MG                            GTTC-TCAATCTTGTTCCTGCATGGGTTAGTATGGACGAAGTCGACCTGCGTATCACTAAATTGTTTGATACTAAGGGT
188-Serranopólis/GO                       AAAAGGTAACTTAGTTCCTGCATGGGTTAGCATGGAAGCGGTTGATGCCGCCATAAC-GAATTATTTGATACGATGCAT
75-Jaboticabal/SP                         GAAACACAATCTTGTTCCTGCTTGGGTTGGCATGGATGCGGTTGATTTAGAAATCACACGGATGTTTGACTCTAAGCAT
6-Pedregulgo/SP                           GA-ACTTGATCTAATTCCAGCTTGGGTTAGCA-GGAATCAGTCGACCGAGCGTATTACACGTATGTTTGATACGAAGGGT
246-Carmo do Cajuru/MG                    AGTC-TCAA-CTTGTTCCTGCCTGGGTTA-CATGGA-GACGTCGATG-GCATATCACTCAATTGTTCGATACTAAGGGT
283-Lins/SP                               GAGACATAACATCGTGTCGGCCTGGGTATCGATGGACGCGGTTGATCAACGTATCACCCATATGTTTGACTCCAAGAAT
KC865829 Avian picobirnavirus             GAAATTCAATCTAGTCCCTGCTTGGGTTAGCATGGATGCGGTTGATAAAAAGATCACTGATTTGTTCGATACCAAGTCT
KC865826 Avian picobirnavirus             GAAATTCAATCTAGTCCCTGCTTGGGTTAGCATGGATGCGGTTGATAAAAAGATCACTGATTTGTTCGATACCAAGTCT
KC846783 Porcine picobirnavirus           AAATCATAATATTGTCCCTGCATGGGTTGGCATGGACGCGGTTGATAAGGAAATCACCATGATGTTTGACACCAAGGAT
KP843617 Bovine Picobirnavirus Brasil     GCGTTACAATGTTGTACCAGCTTGGATCAGCATGGAAGCCGTTGACAAACGTATTACCGATATGTTTGATACAAAGGGC
HM803965 Turkey Picobirnavirus            ACGCCATGGTATCGTTCCAGCTTGGATAAGTATGGATGCCGTTGACATGCGTATCACCAACATGTTTGATACTAAAGGC
JX310440 Bovine Picobirnavirus India      ATCCTTCAACCTCGTTCCTGCTTGGGTTAGCATGGAATCAGCAGATGATCGTATCACTGATTTGTTGGACACAAAGAAT
JX310441 Bovine Picobirnavirus India      ACGCTTTACTCTAGTTCCTGCTTGGGTAACCATGGACGCATTGGACGTTCGTATTACAAGATTGTTCGATACTAAAGAA
KC846792 Porcine picobirnavirus           ACGCACCAATCTTGTACCTGCTTGGATTAGCATGGACGCTGTGGACTTAGCTATCACTCGAATGTTCGATACTAAGGGC
KC865807 Avian picobirnavirus             ACGTTTCAACTTAGTTCCTGCTTGGGTTAGCATGGAATCAGTGGATCGACGTATCACTCGTATGTTCGATACCAAGGAC
KC865804 Avian picobirnavirus             ACGTTTCAACTTAGTTCCTGCTTGGGTTAGCATGGAATCAGTGGATCGACGTATCACTCGTATGTTCGATACCAAGGAC
AB517739 Human picobirnavirus             AAAGTTCAATCTGGTTCCAGCTTGGGTTAGCATGGAATCTGTTGACCGACGTATTACTCACGTTGTTCGATACGAAGGGA
GQ915029 Human picobirnavirus             AAAGTTTAATCTGGTTCCTGCTTGGGTTAGCATGGAAGCAGTGGACAAACGTATTACTAAGTTGTTCGATACCAAGTCT
AB517736 Human picobirnavirus             GAATTTCAATCTCGTACCAGCTTGGGTTAGCATGGATGCGGTCGACCAACGTATCACTAAAATGTTTGATACGAAGGCA
KC846797 Porcine picobirnavirus           GAAATTCGATCTTGTTCCAGCTTGGGTTAGCATGGAATCAGTTGACAAAAGGGTCACCCAACTCTTTGATACCAAGGA
AB517732 Human picobirnavirus             GAAATTTGATCTTGTTCCAGCTTGGGTTAGCATGGAATCAGTTGACCGAAGAATTACTAAGATGTTTGATTCTAAGGGT
GQ221268 Bovine Picobirnavirus India      GGACAAAAACCTCATAGCGCCATGGATTGGTTTATCCGCTGTTGATCGGCGCATTAGCAACTGTTTGAGACCAAGCGA
```

Figura 7. Visão parcial (79nt) do alinhamento entre as sequências nucleotídicas das 11 amostras detectadas por RT-PCR no presente estudo, a partir das amostras fecais testadas e outras sequências de PBV conhecidas, recuperadas do GenBank, conforme a tabela 2. As amostras detectadas no presente estudo estão em destaque.

	Identidade (%)																										
Vírus com seus números correpondentes	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**
1: BovinePBV RUB - P	—	51.52	62.20	53.50	53.50	59.48	61.15	59.24	54.73	49.46	59.24	63.06	58.33	60.27	65.61	61.65	61.04	61.04	59.57	59.57	61.15	59.87	60.51	63.06	63.06	62.42	60.51
2: 188-Serranopolis/GO ●	51.52	—	56.48	65.15	65.15	63.08	63.64	62.88	57.26	60.44	58.33	57.58	57.02	53.28	58.33	53.85	60.00	56.45	54.24	51.52	59.85	55.30	56.06	56.82	56.82	57.58	59.85
3: 283-Lins/SP ●	62.20	56.48	—	67.72	67.72	70.08	74.02	66.93	64.80	60.00	62.99	64.57	67.46	64.80	68.50	65.57	69.05	69.05	65.08	56.59	69.29	63.78	62.99	64.57	64.57	59.06	61.42
4: AvPBV AVE_108	53.50	65.15	67.72	—	100.00	74.51	75.16	71.34	72.30	67.74	73.25	70.06	68.75	64.38	71.34	63.16	70.78	69.59	68.09	63.06	74.72	66.88	70.06	70.06	70.06	70.70	75.16
5: AvPBV AVE_104	53.50	65.15	67.72	100.00	—	74.51	75.16	71.34	72.30	67.74	73.25	70.06	68.75	64.38	71.34	63.16	70.78	69.59	68.09	63.06	74.52	66.88	70.06	70.06	70.06	70.70	75.16
6: 675-Jaboticabal/SP ●	59.48	63.08	70.08	74.51	74.51	—	82.35	64.71	68.71	63.04	66.01	71.24	69.44	62.07	69.28	63.16	71.71	68.03	63.12	60.13	67.97	66.01	70.59	71.24	70.59	68.63	69.28
7: PigPBV CHH-B4	61.15	63.64	74.02	75.16	75.16	82.35	—	64.33	70.95	61.29	66.88	69.43	70.14	64.38	68.15	64.66	70.13	66.89	68.09	59.87	71.34	67.52	68.79	66.88	66.24	63.06	67.52
8: BovinePBV PTN P2	59.24	62.88	66.93	71.34	71.34	64.71	64.33	—	68.42	61.29	70.70	69.43	63.89	65.75	70.06	65.41	71.43	72.30	63.83	66.88	70.70	64.33	66.88	70.06	70.06	66.88	72.61
9: 19-Pedregulho ●	54.73	57.26	64.80	72.30	72.30	68.71	70.95	68.42	—	57.78	71.62	68.24	67.61	63.89	65.54	67.18	70.75	66.44	68.25	64.19	68.24	67.57	70.27	66.22	66.22	65.54	64.19
10: 246-Carmo ●	49.46	60.44	60.00	67.74	67.74	63.04	61.29	61.29	57.78	—	63.27	65.59	70.93	58.24	65.59	68.29	72.83	64.84	72.29	62.37	58.06	58.06	67.74	64.52	64.52	70.97	69.89
11: PigPBV CHHN – B18	59.24	58.33	62.99	73.25	73.25	66.01	66.88	70.70	71.62	63.27	—	81.53	69.44	73.29	77.71	78.20	79.22	78.38	66.67	54.33	71.97	66.24	68.15	67.52	66.24	73.89	72.61
12: HPBV GPBV10	63.06	57.58	64.57	70.06	70.06	71.24	69.43	69.43	68.24	65.59	81.53	—	72.22	70.55	80.89	81.20	76.62	77.03	68.79	63.06	71.97	66.24	66.24	71.97	71.34	78.98	74.52
13: 115-Machado/SP ●	58.33	57.02	67.46	68.75	68.75	69.44	70.14	63.89	67.61	70.93	69.44	72.22	—	71.63	76.39	72.18	79.86	74.83	69.29	65.97	68.06	67.36	72.22	68.75	68.06	72.22	70.14
14: 164-Jaboticabal ●	60.27	53.28	64.80	64.38	64.38	62.07	64.38	65.75	63.89	58.24	73.29	70.55	71.63	—	74.66	73.85	82.07	77.24	68.12	62.33	69.86	63.70	68.49	67.81	69.18	69.18	65.75
15: HPBV GPBV 12	65.61	58.33	68.50	71.34	71.34	69.28	68.15	70.06	65.54	65.59	77.71	80.89	76.39	74.66	—	78.20	83.77	82.43	62.41	64.97	73.89	66.88	70.06	71.34	70.70	75.16	75.80
16: 6-Pedregulho/SP ●	61.65	53.85	65.57	63.16	63.16	63.16	64.66	65.41	67.18	68.29	78.20	81.20	72.18	73.85	78.20	—	83.46	84.85	65.15	66.17	68.42	63.13	69.17	64.42	66.92	73.68	69.92
17: 20-Pedregulho/SP ●	61.04	60.00	69.05	70.78	70.78	71.71	70.13	71.43	70.75	72.83	79.22	76.62	79.86	82.07	83.77	83.46	—	87.76	70.00	63.64	72.73	66.23	72.08	69.48	68.83	75.32	73.38
18: 21-Pedregulho/SP ●	61.04	56.45	69.05	69.59	69.59	68.03	66.89	72.30	66.44	64.84	78.38	77.03	74.83	77.24	82.43	84.85	87.76	—	66.43	64.86	73.75	67.57	72.97	72.97	72.97	72.97	70.27
19: 24-Pedregulho/SP ●	59.57	54.24	65.08	68.09	68.09	63.12	68.09	63.83	68.25	72.29	66.67	68.79	69.29	68.12	62.41	65.15	70.00	66.43	—	63.12	68.09	68.79	71.63	69.50	68.79	65.25	64.54
20: BovinePBV PTN P120	59.57	51.52	56.59	63.06	63.06	60.13	59.87	66.88	64.19	62.37	54.33	63.06	65.97	62.33	64.97	66.17	63.64	64.86	63.12	—	63.06	64.97	71.34	65.61	65.61	68.15	71.34
21: BovinePBV PBV18_PR	61.15	59.85	69.29	74.72	74.52	67.97	71.34	70.70	68.24	58.06	71.97	71.97	68.06	69.86	73.89	68.42	72.73	73.75	68.09	63.06	—	80.89	73.89	73.25	73.25	70.70	71.34
22: TurkeyPBV MD-2010	59.87	55.30	63.78	66.88	66.88	66.01	67.52	64.33	67.57	58.06	66.24	66.24	67.36	63.70	66.88	63.13	66.23	67.57	68.79	64.97	80.89	—	68.79	69.79	69.79	66.24	68.79
23: PigPBV CHHN – B13	60.51	56.06	62.99	70.06	70.06	70.59	68.79	66.88	70.27	67.74	68.15	66.24	72.22	68.49	70.06	69.17	72.08	72.97	71.63	71.34	73.89	68.79	—	75.16	75.16	71.34	71.34
24: AvPBV AVE 61v1	63.06	56.82	64.57	70.06	70.06	71.24	66.88	70.06	66.22	64.52	67.52	71.97	68.75	67.81	71.34	64.42	69.48	72.97	69.50	65.61	73.25	69.79	75.16	—	98.73	80.25	77.71
25: AvPBV Ave 57v1	63.06	56.82	64.57	70.06	70.06	70.59	66.24	70.06	66.22	64.52	66.24	71.34	68.06	69.18	70.70	66.92	68.83	72.97	68.79	65.61	73.25	69.79	75.16	98.73	—	80.25	77.71
26: HPBV GPBV 12	62.42	57.58	59.06	70.70	70.70	68.63	63.06	66.88	65.54	70.97	73.89	78.98	72.22	69.18	75.16	73.68	75.32	72.97	65.25	68.15	70.70	66.24	71.34	80.25	80.25	—	85.25
27: HPBV Park-HPBV-2	60.51	59.85	61.42	75.16	75.16	69.28	67.52	72.61	64.19	69.89	72.61	74.52	70.14	65.75	75.80	69.92	73.38	70.27	64.54	71.34	71.34	68.79	71.34	77.71	77.71	85.25	—

Observação: Os nomes dos vírus estão elencados na primeira coluna precedidos por números. Esses mesmos números estão dispostos na segunda linha do quadro, representando os nomes dos vírus.

Quadro 2. Comparação das porcentagens de identidade das sequências nucleotídicas para fragmento de 201bp do gene RpRd de picobirnavírus bovino, entre 11 amostras detectadas por RT-PCR no presente estudo estão em destaque e sequências de outros picobirnavírus (humano, peru, bovino, suíno, aviário) recuperadas do GenBank.

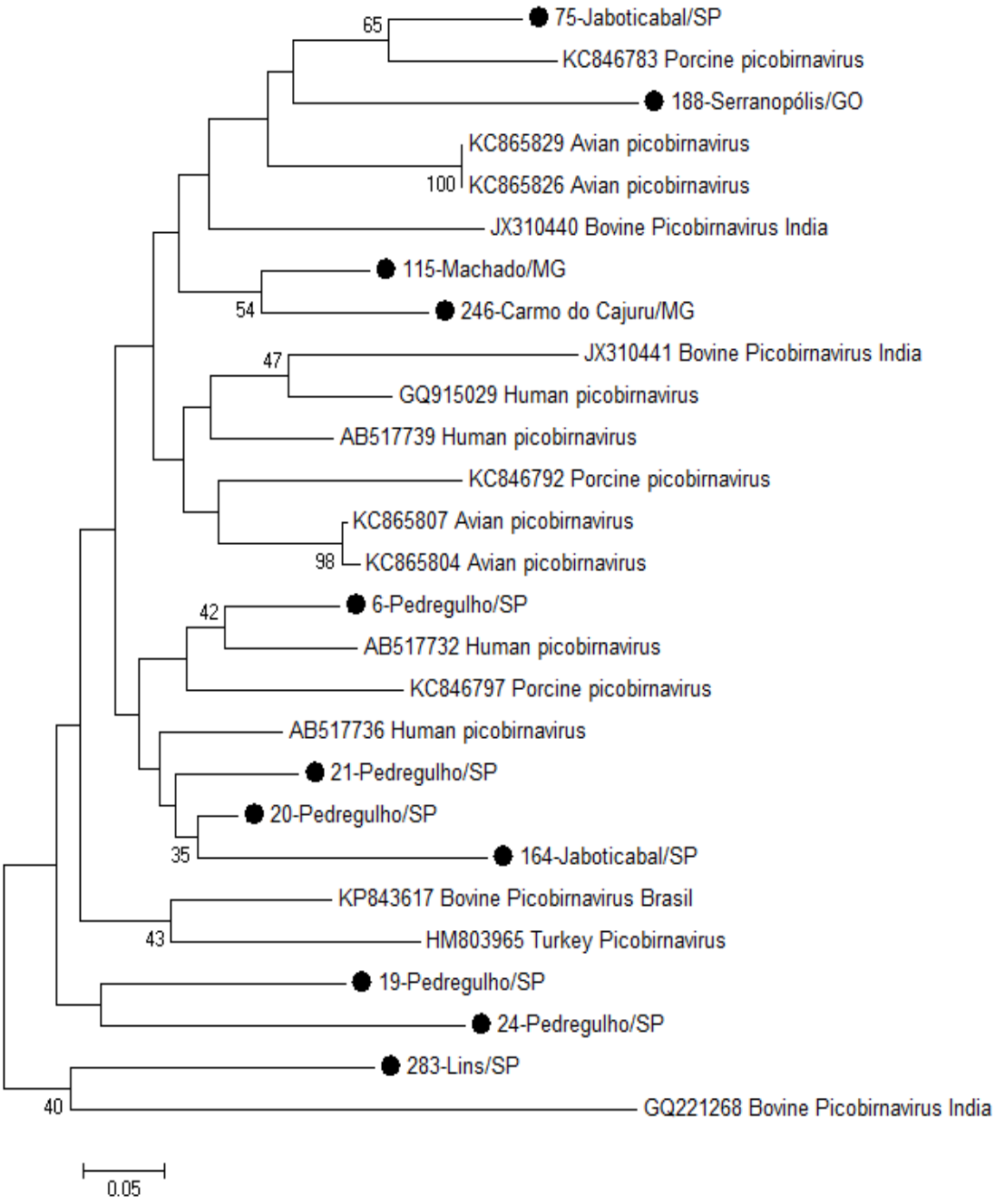


Figura 8. Cladograma representando reconstrução filogenética através do método *Neighbor-Joining* (NJ), utilizando-se o modelo de substituição Kimura-2-Parâmetros com suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas entre sequências genômicas de PBV do genogrupo I, relativas a produto de 201pb do gene RpRd. As sequências obtidas neste estudo estão em destaque.

5. DISCUSSÃO

A presente investigação, na perspectiva de bioprospecção de agentes virais entéricos bovinos no Brasil, objetivou a detecção e caracterização de picobirnavírus bovino em animais com e sem sinais clínicos de diarréia, procurando-se contribuir com a identificação e caracterização de possíveis agentes de ação enteropatogênica em bovinos no Brasil, dada a limitação de estudos associados ao tema.

Na presente investigação, amostras fecais de bovinos pertencentes a rebanhos de diferentes municípios da região centro-sul do país foram testadas, permitindo previamente à realização do trabalho de prospecção, subsidiar a eventual detecção de variantes de picobirnavírus bovino em circulação no país associada a fatores de variabilidade geográfica, para os quais os vírus de RNA são susceptíveis, contribuindo preponderantemente para a ecologia desses microrganismos (DUKE-SYLVESTER et al., 2013).

Para detecção de RNA viral de picobirnavírus bovino, optou-se por utilizar o procedimento de RT-PCR buscando-se amplificação de fragmento do gene RdRp, segundo ROSEN et al. (2000). Do total de amostras testadas, 18 apresentaram positividade através da técnica de RT-PCR, confirmando, a circulação de picobirnavírus bovino em 3 estados do Brasil, sendo inédita nos estados de Minas Gerais e Goiás.

Ainda que a RT-PCR aplicada ao gene RdRp apresente níveis de sensibilidade e especificidade adequados (ROSEM et al., 2000), buscou-se confirmar através do sequenciamento nucleotídico, a real identidade dos fragmentos amplificados a partir das amostras fecais. Embora o objetivo inicial fosse sequenciar todas as amostras positivas para amplificação de fragmento do gene RdRp, das 18 amostras, 11 (61,1%) puderam ser sequenciadas, devido à impossibilidade de se realizar o sequenciamento de amostras apresentando valores inferiores a 15 ng/µL de concentração de DNA por amostra; sendo que, mesmo após reamplificações, não obtivemos êxito na obtenção de quantidades necessárias para o sequenciamento tipo Sanger, conforme o protocolo realizado. Este fato pode ter ocorrido devido à baixa

concentração viral nas fezes ou ainda pela degradação de RNA viral em consequência do período de armazenamento das amostras em questão.

Na presente investigação os animais com sinais clínicos de diarreia representaram 27,8% do total testado, enquanto que 72,2% não apresentaram tais sinais; quanto à idade, 61,1% dos animais positivos na RT-PCR para PBV eram bezerros. O presente estudo corrobora resultados de trabalhos já publicados utilizando amostras de fezes bovinas e bubalinas provenientes de animais diarreicos e não diarreicos. BUZINARO et al. (2003) analisaram 576 amostras fecais de bovinos, obtendo 4 amostras positivas para PBV, sendo 2 provenientes de animais com sinais clínicos de diarreia e 2 sem sinais clínicos. MALIK et al. (2011) encontrou uma positividade de 3,67% (5/136), sendo 3 de bezerros de búfalos e 1 de vaca, todos com sinais clínicos de diarreia, e também em 1 búfalo adulto sem diarreia. GHOSH et al. (2009) detectaram por microscopia eletrônica partículas virais de PBV, numa amostra fecal proveniente de bezerro com 1 mês de vida apresentando quadro diarreico. Isso sugere que as infecções de picobirnavírus não estão associadas somente com manifestações gastroentéricas como descrito em vários estudos.

No tocante à análise de composição das sequências nucleotídicas, a identidade para as amostra sequenciadas apresentou uma média de 67,4% quando comparadas umas com as outras, sendo que as amostras que apresentaram maior identidade foram 20-Pedregulho/SP com a 21-Pedregulho/SP (87,76%); já quando comparadas com amostras de PBV de referência a que apresentou maior identidade (83,77%) foi 20-Pedregulho/SP com a AB517736 Human picobirnavírus. Este resultado corrobora os resultados de MALIK et al. (2014), quando identificaram um PBV bovino com uma identidade de 78,7% com PBV humano (3-HUN-01/AJ504796). Quando comparada a amostra 20-Pedregulho/SP com o protótipo PBV bovino RUBV-P, detectado na Índia (GQ221268 Bovine picobirnavírus India), esta obteve uma identidade de 61,05%, mostrando uma alta divergência genética do protótipo, já descrita pelos próprios autores (GHOSH et al., 2009).

Realizou-se a construção de árvore filogenética a partir de onze sequências nucleotídicas geradas neste estudo e de outras 16 sequências de

picobirnavírus de espécies divergentes, de vários países, recuperadas a partir do GenBank. No cladograma obtido, observa-se um perfil de agrupamento heterogêneo, já relatado em estudos anteriores, particularmente entre amostras humanas e suínas (GANESH et al., 2014), indicando uma dinâmica de transmissão interespécie (*cross-species transmission*). Os dados obtidos no estudo ressaltam tal perfil de relacionamento genético, ampliando-o também à espécie bovina, colaborando de forma inédita com a melhor definição dessa dinâmica de transmissão, conforme demandas já indicadas por outros autores (GANESH et al., 2014). Em tempo, das amostras sequenciadas e submetidas à análise filogenética no presente estudo, apenas a amostra 283-Lins/SP demonstrou perfil esperado de agrupamento, ao compor com sequência de outro picobirnavírus bovino (GenBank: CQ221268), oriundo da Índia, um clado em separado, ratificando os dados obtidos pela análise de identidade. A propósito, BHATTACHARYA et al. (2007) e BÁNYAI et al. (2008) relatam que PBV podem apresentar sequências nucleotídica com diferentes níveis de identidade, mesmo sendo classificados como pertencentes ao genogrupo I, indicando a heterogeneidade encontrada entre os PBVs.

Nesse contexto, a caracterização molecular dos fragmentos parciais do gene RdRp do PBV bovino revelou uma alto grau de diversidade genética dentro das sequências de GI, detectadas no presente estudo, circulantes na região centro-sul do país. TAKIUCHI et al. (2015) previamente indicaram tal diversidade com relação até então única sequência nucleotídica de PBV bovino do genogrupo I obtida no país, originária do estado do Paraná, dividindo filogeneticamente um clado com amostra de peru originário dos EUA. Adicionalmente, BÁNYAI et al. (2008) observaram, utilizando técnicas moleculares, a existência de heterogeneidade entre cepas de PBV detectadas em um único hospedeiro. A referida heterogeneidade pode ser explicada pela natureza do material genético do PBV (RNA segmentado), que facilita o rearranjo de sequências, promovendo o surgimento de novas estirpes (NATES, GATTI e LUBERT, 2011).

Essa heterogeneidade genética, considerando o mesmo genogrupo, pode justificar a ausência de amostras positivas relativas ao genogrupo II, também investigado no presente estudo. É plausível que as sequências dos primers utilizados para detecção de cepas GII, no presente estudo, apresentem

complementariedade inferior à necessária para o anelamento dos mesmos dada à diferença de variantes de PBV do GII, limitando a amplificação do gene RpRd, diferindo dos resultados de MALIK et al. (2014) que realizaram a primeira detecção do PBV pertencente ao genogrupo II, na Índia, utilizando os mesmos primers. Por outro lado, também não se pode descartar a possibilidade que, aos menos nas regiões investigadas no presente trabalho, cepas de PBV do genogrupo II não estejam circulando. Não obstante, torna-se notória a necessidade de realização de outras investigações para corroborar ou não tais assertivas, principalmente quando se considera a extensão geográfica do território brasileiro.

6. CONCLUSÕES

1. Através da técnica de RT-PCR aplicada à amplificação de fragmento de 201pb do gene RdRp de picobirnavírus bovino pertencente ao genogrupo I, foram detectadas 18 amostras positivas oriundas de bezerros e de animais jovens, sendo a maioria sem manifestações clínicas de diarréia, originários dos estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais. Sendo inéditas no estado se Goiás e Minas Gerais. Por outro lado, não houve detecção de amostras positivas para o genogrupo II de picobirnavírus bovino no presente estudo.

2. A partir das amostras positivas ao RT-PCR, 11 amostras foram submetidas à análise filogenética, onde observou-se padrão heterogêneo de agrupamento entre sequências oriundas de espécies hospedeiras distintas, corroborando resultados de outros estudos, excetuando-se a amostra 283-Lins/SP que formou clado com variante de picobirnavírus bovino oriundo da Índia, ratificando os dados obtidos pela análise de identidade.

3. Das 18 amostras detectada no presente estudo, 11 não apresentavam sinal clínico de diarréia, sugerindo que as infecções de picobirnavírus podem estar associadas a manifestações gastroentéricas subclínicas ou inaparentes como já descrito em vários estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of Protein data base search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.

BÁNYAI, K., MARTELLA, V., BOGDAN, A., FORGACH,P., JAKAB, F. MELEG, E., BÍRÓ,H., MELEGH, B., SZUCS, G. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. **Journal of General Virology**, n.89, p.534 – 539, 2008.

BÁNYAI, K.; JAKAB, F.; REUTER, G.; BENE, J.; ÚJ, M.; MELEGH, B.; SZUES, G. Sequence heterogeneity among human picobirnavirus detected in a gastroenteritis outbreak. **Archives of Virology**; v.148, p.2281 – 2291, 2003.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J. F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal. Practice**, v.18, p.7-34, 2002.

BHATTACHARYA, R.; SAHOO, G. C.; NAYAK, M. K.; RAJENDRAN, K.; DUTTA, P.; MITRA, U.; BHATTACHARYA, M. K.; NAIK, T.N.; BHATTACHARYA, S.K.; KRISHNAN, T. Detection of genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA prolife causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. **Infection Genetics and Evolution**, v.7, p.229 – 238, 2007.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em 04/01/2016.

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

BUZINARO, M. G.; FREITAS, P. P. S.; KISIELLIUS, J. J. UEDA, M.; JEREZ, J. A. Identification of bisegmented double – stranded RNA virus (picobirnavirus) in calf faeces. **The Veterinary Journal**, p. 185 – 187, 2003.

CAMPANELLA, J. J.; BITINCKA, L.; SMALLEY, J. MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. **BMC Bioinformatics**, v.4, p.29, 2003.

CASCIO, A.; BOSCO, M.; VIZZI, E.; GIAMMANCO, A.; FERRARO, D.; ARISTA, S. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. **European Journal of Epidemiology**, n.12, v.5, p.545–547, 1996.

DELPORT, W.; POON, A. F.; FROST, S. D.; KOSAKOVSKY POND, S. L. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. **Bioinformatics**, v.26, p.2455-2457, 2010

DUKE-SYLVESTER, S. M.; BIEK, R.; REAL, L. A. Molecular evolutionary signatures reveal the role of host ecological dynamics in viral disease emergence and spread. Philos. **The Royal Society**, v.368, p.2-11, 2013.

FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. Editora da UFSM, Santa Maria, 2007.

FREGOLENTE, M. C. D.; CASTRO-DIAS, E.; MARTINS, S. S.; SPILKI, F. R.; ALLEDRITTIC, S. M.; GATTI, M. S. V. Molecular characterization of picobirnaruses from new hosts. **Virus Research**, p.134 – 136, 2009.

GALLIMORE, C. I; APPLETON, H.; LEWIS, D.; et al. Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. **Journal of Medical Virology**, v.45, p.135–140 1995.

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

GANESH, B.; MASACHESSI, G.; MLADENOVA, Z. Animal Picobirnavirus. **Virus Disease**, v.25, p. 223 – 238, 2014.

GANESH, B.; BÁYAI, K.; MARTELLA, V.; JAKAB, F.; MASACHESSI, G.; KOBAYASHI, N. Picobirnavirus infections: viral persistence and zoonotic potential. **Reviews in Medical Virology**, v.22, p.242 - 256, 2012.

GANESH, B.; NATARAJU, S. M.; RAJENDRAN, K.; RAMAMURTHY, T.; KANUNGO, S.; MANNA, B.; NAGASHIMA, S.; SUR, D.; KOBAUASHI, N.; KRISHNAN, T. Detection of closely related picobirnaviruses among diarrhoeic children in Kolkata: evidence of zoonoses? **Infection Genetics and Evolution**, v.10, p.511 – 516, 2010.

GANESH, B.; NAGASHIMA, S.; GLOSH, S.; NATARAJU, S. M.; RANJENDRAN, K.; MANNA, B.; RAMAMURTHY, T.; NIYOGI, S. K.; KANUNGO, S.; SUR, D.; KOBAYASHI, N.; KRISHNAN, T. Detection and molecular characterization of multiple strains of Picobirnavirus causing mixed infection in a diarrhoeic child: Emergence of prototype Genogroup II – like strain in Kolkata, India**. International Journal Molecular Epidemiology Genetic**, v.2; p.61 – 72, 2011.

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

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

GIORDANO, M. O; MARTINEZ, L. C; RINALDI, D.; et al. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. **AIDS Research and Humam Retroviruses**, v. 15, p.1427–1432, 1999.

GIORDANO, M.O.; MARTINEZ, L.C.; RINALDI, D.; GUÍNARD, S.; NARETTO, E.; CASERO, R.; YACCI, M.R.; DEPETRIS, A.R.; MEDEOT, S.I.; NATES, S.V. Detection of picobirnavirus in HIV-infected patients with diarrhea in Argentina. **Journal Acquir Immune Deficency Syndrome Humam Retrovirol.**, v.18, p. 380 – 383, 1998.

GILLMAN, L.; SÁCHEZ, A. M.; ARBINA, J. Picobirnavirus in captive animals from Uruguay: identification of new hosts. **Intervirology**, n. 56, p. 46 – 49, 2013.

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

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

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

HAGA, I.R.; MARTINS, S.S.; HOSOMI, S.T. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (Picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **The Veterinary Journal**, n. 158, p.234 –236, 1999.

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

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

HOET, A. E.; NIELSEN, P. R.; HASOKSUZ, M.; THOMAS, C.; WITTUM, T. E.; SAIF, L. J. Detection of bovine torovirus and other enteric pathogens in feces from diarrhea cases in cattle. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v.15, p.205–212, 2003.

KANEENE, J. B.; HURD, H. S. The national animal health monitoring system in Michigan. III. Cost estimates of selected dairy cattle diseases. **Preventive Veterinary Medicine**, v.8, p.127-140, 1990.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research,** v.9, p.868–877, 1999.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. **Comput. Appl. Biosci.**, v.10, p.189–191, 1994.

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

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

LUDERT JE, LIPRANDI F. Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis. **Research Virology**, p.219–24, 1993.

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

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

MALIK, Y. S.; SHARMA, A. K.; KUMAR, N.; SHARMA, K.; GANESH, B.; KOBAYASHI, N. Identification and characterisation of a novel genogroup II picocirnavirus in a calf in India. **Veterinary Record**, 2014.

MALIK, Y. S.; CHANDRASHERKAR, K. M.; SHARMA, K.; HAQ, A. A.; VAID, N.; CHAKRAVARTI, S.; BATRA, M.; SINGH, R.; PANDEY, A. B. Pocobirnavirus detection in bovine and buffalo calves from foothills of Himalaya and Central India. **Tropical Animals Health Production**, v.43, p. 1475 – 1478, 2011.

MONDAL, A.; MAJEE, S. Novel bisegmented virus (picobirnavirus) of animals, birds and humans. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.2; p. 154 – 158, 2014.

MONDAL, A.; CHAKRAVARTI, S.; MAJEE, S. B.; BANNLINK, A. S. Detection of pocobirnavirus and rotavirus in diarrhoeic faecal samples of cattle and buffalo calves in Mumbai metropolis, Western India. **Veterinaria Italiana**, v.4, p.357 – 360, 2013.

NATES, S. V.; GATTI, M. S. V.; LUDERT, J. The picobirnavirus: an integrated view on its biology, epidemiology and pathogenic potential. **Future Virology.**, v.6, p.223 – 235, 2011.

PEREIRA, H. G.; FIALHO, A. M.; FLEWETT, T. H.; TEIXEIRA, J. M. S.; ANDRADE, Z. P. Novel viruses in human faeces. **The Lancet**, 1988a.

PEREIRA, BY H. G.; FLEWETT, T. H.; CANDEIAS, J. A. N. BARTH, O. M. A virus with a bisegmented double – stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestine. **Journal of General Virology**, v.69, p.2749 – 2754, 1988.

POND, S. L. K.; MURRELL, B.; FOURMENT, M.; FROST, S. D.; DELPORT, W.; SCHEFFLER, K. A random effects branch-site model for detecting episodic diversifying selection. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, p.3033–3043, 2011.

PONGSUWANNA, Y.; TANIGUCHI, K.; CHIWAKUL, M.; URASAWA, T.; WAKASUGI, F.; JAYAVASU, C.; URASAWA, S. **Journal Clinical Microbiology**, v.34, p.1050 – 1057, 1996.

RENSHAW, R. W.; RAY, R.; DUBOVI, E. J. Comparison of virus isolation and reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of bovine viral diarrhea virus in bulk milk tank samples. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v.12, p.184–186, 2000.

RADOSTITS, O. M.; BLOOD, D. C.; GAY, C. C.; HINCHCLIFF, K. Diseases of the alimentary tract. In: **Veterinary medicine**: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses, 9.ed., p. 234–246, 2000.

ROSEN, B. I; FANG, Z. Y.; GLASS, R. I.; MONROE, S. S. Cloning Human Picobirnavirus Genomic Segments and Development of an RT-PCR Detection Assay**. Virology**, v.227, p.316-329, 2000.

ROZAS, J.; SANCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X., ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v.19, p.2496–2497, 2003.

SILVA, R. R.; BEZERRA, A. M.; KAIANO, J. H. L.; OLIVEIRA, D. S.; SILVESTRE, R. V. D.; GABBAY, Y. B.; GANESH, B.; MASCARENHAS, J. D. P. Genogroup I avian picobirnavirus detected in Brazilian broiler chickens: a molecular epidemiology study. **Journal of General Virology**, v.95, p. 117 – 122, 2014.

SOUZA, F. M. Ivenstigação de vírus entéricos de interesse em saúde pública (Rotavírus A, B E C, Noravírus e Sapovirus) em primatas não humanos em localidades do sul Brasil, 2011. Dissertação (Mestrado em ciência farmacêutica) Universidade do Paraná, Curitiba.

SYMONDS, E. M; GRIFFN, D. W.; BREITBART, M. Eukaryotic viruses in Wastewater samples from the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, n.5, v. 75, 2009.

TAKIUCHI, E.; MACEDO, R.; KUNZ, A. F.; GALLEGO, J. C.; MELLO, J. L.; OTONEL, R. A.; ALFIERI, A. A. Electrophoretic RNA genomic profiles of Brazilian Picobirnavirus (PBV) strains and molecular characterization of a PBV isolated from diarrheic calf. **Virus Research.** v.211, p.58-63, 2015.

TAMEHIRO, C., ALFIERI, A. F., MEDICI, K.C., ALFIERI, A. A. Segmented double-stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.34, p.349–353, 2003.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.4876–4882, 1994.

VAN LEEUWEN, M.; WILLIAMS, M. M. W.; KORAKA, P., SIMON, J. H.; SMITS, S. L.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Human picobirnaviruses identified by molecular screening of diarrhea samples. **Journal Clinical Microbiology**, v.48, p.1787 – 1794, 2010.

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

VIRTALA, A. K.; MECHOR, G. D.; GRÖHN, Y.T.; ERB, H. N. Morbidity from nonrespiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.208, p.2043-2046, 1996.

WANG, Y.; BÁNYAI, K.; TU, X.; JIANG, B. Simian Genogroup I Picobirnaviruses: Prevalence, Genetic Diversity and Zoonotic Potential. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50, n.8, p.2779-2782, 2012.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; BAI, R.; TENG, J. L. L.; LEE, P.; MARTELLI, P.; HUI, S. W.; YUEN, K. Y. Complete genome sequence of a novel picobirnavirus, otarine picobirnavirus, discovered in California Sea Lions. **Journal of Virology**, v.86, p.6377 – 6378, 2012.

APÊNDICE

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
5	Macho da Graciosa	2 meses	M	Leite	Mestiço (holandês-gir-nelore) / Sistema semi-intensivo	Pedregulho-SP	03/07/07		X
6	Macho da Dengosa	2 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
9	289	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
12	Macho da Dama	5 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
17	Macho da Garça	5 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
19	278 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
20	279 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
21	268 vacinada	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
24	282 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
25	276 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 3. Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continua).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
30	----------	7 meses	F	Corte	Mestiço (guzerá, canchim e red angus) / Sistema extensivo	Claraval-MG	17/09/07		X
31	202	13 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
32	104	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
33	270	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
36	271	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
37	136	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
40	86	8 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
50	300	4 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
52	177	3 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
56	103	3 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
60	68	40 dias	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 3. Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continua).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
61	479	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
63	169	50 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
75	1352	2 meses e 26 dias	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema intensivo (vacas e bezerras) e semi-intensivo (novilhas)	Jaboticabal-SP	28/09/07		X
77	1354	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
83	282	9,5 anos	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema intensivo (vacas e bezerras); Sistema semi-intensivo (novilhas)	Machado-MG	07/12/07		X
88	1122	2,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
90	548	4,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
92	315	9 anos	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 3. Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continua).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
95	709	1 ano	F	idem	idem	idem	idem		X
101	1151	6 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
107	741	7 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
108	742	7 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
113	734	8,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
115	736	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
116	1146	9 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
122	720	1 ano	F	idem	idem	idem	idem		X
123	729	9,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
131	1139	1,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
141	01/08		M	Leite	Holandês preto e branco/ Sistemas intensivo e semi-intensivo	Descalvado-SP	11/04/08	X	

Quadro 3. Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continua).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
146	09/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
147	15/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
149	19/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
150	20/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
155	38/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
159	46/08	15 dias	F	Corte	Mestiço (nelore, guzerá/Sistema extensivo)	Catiguá-SP	14/07/08	X	
164	77/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
166	79/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
167	80/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
170	83/08	46-60 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	

Quadro 3. Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continua).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
176	195/08	1-5 dias	M	Corte	Mestiço (Sistema extensivo)	Cassilândia-MS	04/09	X	
188	285/08	16-20 dias	M	idem	idem	idem	Idem	X	
190	288/08	16-20 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
193	GUI	20 dias	M	Leite	Holandês preto e branco/sistema semi-intensivo	Descalvado-SP	17/1/2012	X	
195	5186	15 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
201	3477	10 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
202	5177	17 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
203	4945	16 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
205	5163	24 dias	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 3. Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continua).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
211	UVA 193	10 dias	M	211	Holandês preto e branco/ Sistema semi-intensivo	Araras-SP	28/02/2012	X	
213	ABACATE 195	26 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	
215	ARROZ 197	10 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	
216	SEU HUDSON 198	10 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	
219	03	30 dias	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema semi-intensivo	Rosário do Sul/RS	20/10/2009	X	
246	S61	60 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010		X
247	S62	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
248	S63	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
250	S65	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
251	S66	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X

Quadro 3. Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continua).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
256	571	60 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010		X
259	574	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
263	526	45 dias	M	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010	X	
263	526	45 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
266	529	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
271	534	1 semana	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
283	688	15 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Lins/SP	18/07/2010	X	
284	689	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	

M = Masculino F = Feminino I = Idem

Quadro 3 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (conclusão).

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
Seção de Apoio Acadêmico

Ofício SCAPACAD/CEP/FZEA/025/2015
DMM/sas

Pirassununga, 26 de outubro de 2015

Senhor Pesquisador,

Do assunto em documento encaminhado na data de 29 de setembro de 2015 aos Comitês de Ética no Uso de Animais (CEUA) e Ensino, porém solicito que seja informado a vigência (início e término) do projeto intitulado: **"Detecção e caracterização moleculares de picobírnavírus em bovinos da região centro-sul do Brasil."**, sob responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, baseando-se nos pareceres anteriormente emitidos e aprovados por esta mesma Comissão, a saber: Projeto intitulado: "Detecção e caracterização moleculares de Astrovírus em bovinos das regiões nordeste do estado de São Paulo e sudoeste do estado de Minas Gerais." protocolo **13.1.543.74.2**, cuja referência que não houve alterações no manejo e no protocolo previamente submetido.

Respeitosamente,

Profa. Dra. Daniela dos Santos Martins
Presidente CEP FZEA/USP

Professor Doutor Ricardo Luiz Moro de Sousa
MV Responsável Técnico do DMV - FZEA

Av. Duque de Caxias Norte, 225 - Jardim Elite - Pirassununga - SP
Fone: (19) 3565-4200 | e-mail: cep@usp.br