

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**MARCELO CANDIDO**

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

Pirassununga  
2014

MARCELO CANDIDO

Detecção e caracterização moleculares de *Astrovirus* 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 obtenção do Título de Mestre em Zootecnia

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

Pirassununga  
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

C217d Candido, Marcelo  
Detecção e caracterização moleculares de *Astrovirus*  
bovino na região centro-sul do Brasil / Marcelo Candido.  
-- Pirassununga, 2014.  
93 f.  
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.  
Departamento de Medicina Veterinária.  
Área de Concentração: Qualidade e Produtividade  
Animal.  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa.

1. Astrovirus bovino 2. Sanidade bovina  
3. Epidemiologia molecular. I. Título.

*A meus pais, por todo amor e dedicação*

## **Agradecimentos**

*Primeiramente a Deus pela conquista, força e dedicação na trajetória.*

*Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa, pela orientação, confiança e exemplo profissional.*

*A Prof. Dr<sup>a</sup>. Andrezza Maria Fernandez, pela oportunidade de iniciar minha carreira acadêmica na Universidade de São Paulo, pelos conselhos e confiança.*

*Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Mendes Maia, pela confiança e amizade.*

*A Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria da Glória Buzinaro, pelo fornecimento das amostras e confiança.*

*A Dr<sup>a</sup>. Sabrina Ribeiro de Almeida Queiroz, pelo conhecimento transmitido e amizade.*

*A Rafaela Torrezan Privatti, pelo apoio nos momentos difíceis.*

*Aos meus pais e irmão, pelo apoio e carinho.*

*Ao financiamento fornecido pela FAPESP, o qual possibilitou minha dedicação exclusiva à pesquisa e à escrita desta dissertação.*

*A todos os funcionários, alunos de pós-graduação e iniciação científica dos laboratórios de Higiene Zootécnica e Multiusuário de Microbiologia que contribuíram para a realização deste trabalho.*

*E aos demais professores da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, pelos conselhos e contribuições.*

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

*Theodore Roosevelt*

## RESUMO

CANDIDO, M. **Detecção e caracterização moleculares de *Astrovirus* bovino na região centro-sul do Brasil**. 2014. 93f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

As doenças entéricas associadas com diarreia, desidratação e perda de peso constituem um dos principais problemas da bovinocultura mundial, contribuindo para expressivos índices de morbidade e mortalidade, principalmente entre neonatos. Nesse contexto, exigências para o aprimoramento do diagnóstico laboratorial de doenças entéricas de natureza infectocontagiosa, tornaram-se constantes, face às perdas econômicas vinculadas. Entre os principais enteropatógenos virais, de distribuição mundial e história recente, destaca-se o astrovírus bovino (BoAstV), cuja primeira identificação data de 1978. BoAstV entérico induz diarreia principalmente entre neonatos e imunocomprometidos, tendo uma prevalência acima de 60% nas 5 primeiras semanas de vida dos animais. Devido à carência de dados a respeito da prevalência desse vírus no Brasil, o presente estudo foi realizado objetivando a detecção e caracterização moleculares de cepas de BoAstV em amostras fecais de bovinos com e sem diarreia de diferentes idades. O estudo foi conduzido a partir de 272 animais em diferentes estados do Brasil, obtendo-se 14,3% de positividade através de RT-PCR, sendo que 11 amostras, provenientes dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, foram submetidas ao sequenciamento nucleotídico. A similaridade entre as sequências deduzidas de aminoácidos das amostras obtidas foi maior do que 86,8%, quando comparadas umas com as outras, e situou-se entre 86,2 a 94,8% quando comparadas com sequências de outros BoAstV descritos. Nas reconstruções filogenéticas, 9 amostras agruparam-se conjuntamente em clado distinto de outros BoAstV, uma amostra (BoAstV-155-BRA) formou ramo parafilético a clado que agrupa tanto outros BoAstV como astrovírus de cervídeos e a amostra restante (BoAstV-267-BRA) formou ramo basal aos astrovírus bovinos e suínos. No entanto, o posicionamento das 2 amostras divergentes (BoAstV-155-BRA e BoAstV-267-BRA) não derivou de episódios de seleção positiva ou recombinação. Em síntese, os resultados obtidos indicam, de maneira inédita, a circulação de variantes de BoAstV entérico em rebanhos de estados da região centro-sul do Brasil.

Palavras-chave: astrovírus bovino; sanidade bovina; epidemiologia molecular.

## ABSTRACT

CANDIDO, M. **Molecular detection and characterization of bovine *Astrovirus* in central-south region of Brazil**. 2014. 93f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

Enteric diseases associated with diarrhea, dehydration and weight loss is one of the major problems of cattle worldwide, contributing to significant morbidity and mortality, especially among newborns. In this context, demands for improving the laboratory diagnosis of infectious enteric diseases, became constant, given the economic losses involved. Among the major viral enteropathogens of worldwide distribution and recent history, highlight the bovine astrovirus (BoAstV), whose first mention dates from 1978. Enteric BoAstV induce diarrhea especially among newborns and immunocompromised animals, having a prevalence above 60% in the first 5 weeks of life. Due to lack of data concerning the occurrence of this virus in Brazil, the present study was aimed at molecular detection and characterization of BoAstV strains in fecal samples from cattle with and without diarrhea of different ages. The study was conducted on 272 animals from different states of Brazil, obtaining positivity of 14.3% by RT-PCR, and 11 samples from the states of São Paulo, Minas Gerais and Rio Grande do Sul were subjected to nucleotide sequencing. The similarity between the deduced amino acid sequences of the samples was greater than 86.8% when compared with each other and was between 86.2 to 94.8% compared with sequences of other BoAstV described. In phylogenetic reconstructions, 9 samples were grouped together in a separate clade from other BoAstV, a sample (BoAstV-155-BRA) formed a paraphyletic branch to a clade that groups both other BoAstV and deer astrovirus and the remaining sample (267-BRA-BoAstV) formed a basal branch to bovine and porcine astrovirus. However, the positioning of the two different samples (BoAstV-155-BRA and BoAstV-267-BRA) did not derive from episodes of positive selection or recombination. In summary, the results indicate, in an unprecedented manner, the circulation of enteric BoAstV variants in herds of cattle from states of the south-central region of Brazil.

Keywords: bovine astrovirus; bovine health; molecular epidemiology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Microscopia eletrônica de astrovírus bovino .....	16
Figura 2 - Representação esquemática do genoma de astrovírus bovino .....	17
Figura 3 - Localização dos municípios onde foram coletadas as amostras fecais.....	38
Figura 4 - Localização dos municípios onde foram coletadas as amostras fecais positivas ....	39
Figura 5 - Fotografia de gel de agarose ilustrando amplicons obtidos para actina bovina .....	44
Figura 6 - Fotografia de gel de agarose ilustrando amplificação de fragmento do gene <i>pol</i> de BoAstV .....	45
Figura 7 - Fotografia de gel de agarose ilustrando ampliações de fragmentos do gene <i>pol</i> de BoAstV .....	46
Figura 8 - Alinhamento das sequências nucleotídicas de fragmento de 80pb do gene <i>pol</i> de astrovírus bovino.....	48
Figura 9 - Sequências deduzidas de aminoácidos alinhadas .....	49
Figura 10 - Reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referentes a fragmento de 432bp do gene <i>pol</i> de astrovírus bovino .....	52
Figura 11 - Reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências deduzidas de aminoácidos referentes a fragmento de 432bp do gene <i>pol</i> de astrovírus bovino .	53
Figura 12 - Gráficos comparativos <i>sliding window</i> de razões <i>Ka/Ks</i> .....	54

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Primers utilizados nas reações de RT-PCR para astrovírus bovino .....	26
Tabela 2 - Sequências nucleotídicas de astrovírus utilizadas para reconstrução filogenética.	32

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação dos animais amostrados e positivos para astrovírus bovino.....	40
Quadro 2 - Amostras positivas e sequenciadas de astrovírus bovino detectadas no presente trabalho e depositadas no GenBank .....	47
Quadro 3 - Comparação das porcentagens de similaridade e identidade das sequências nucleotídicas de astrovírus bovino detectadas no presente trabalho e sequências de outros astrovírus .....	50
Quadro 4 - Comparação das porcentagens de similaridade e identidade de sequências de aminoácidos de astrovírus bovino detectadas no presente trabalho e sequências de outros astrovírus .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Por cento

> - Maior

≤ - Menor ou igual

ANV - Vírus da nefrite aviária

AstV - Astrovírus

BatAstV - Astrovírus que hospedam morcegos

BoAstV - Astrovírus bovino

bp - Par de base

CaAstV - Astrovírus canino

Caco-2 - Células de adenocarcinoma coloretal humano

CAstV - Astrovírus que hospedam frangos

CcAstV - Astrovírus que hospedam cervídeos

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DVH2 - Vírus da hepatite tipo 2 em patos

FAstV - Astrovírus felino

HAstV - Astrovírus humano

HEK - Células de rim de embrião humano

kb - Kilobase

kDa - Kilodaltons

MDBK - Células de rim de bovino

MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio

mL - Mililitro

mM - Milimolar

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

nt - Nucleotídeo

OAstV - Astrovírus ovino

°C - Grau Celsius

ORF - Open reading frame

PAstV - Astrovírus suíno

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

*Pol* - Polimerase

RatAstV - Astrovírus que hospedam ratos

RdRp - RNA polimerase dependente

RNA - Ácido ribonucleico

RT - Transcriptase reversa

SRV - Small round viroses

TAE - Tris-Acetato/EDTA

µg - Micrograma

µL - Microlitro

µM - Micromolar

\*Dado o fato de algumas abreviaturas terem sido consagradas na literatura especializada, seguem sua grafia no idioma inglês.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	IMPORTÂNCIA E CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS.....	14
1.2	CULTIVO CELULAR E REPLICAÇÃO.....	17
1.3	HOSPEDEIROS .....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1	COLHEITA DE AMOSTRAS FECAIS .....	25
3.2	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR ASTROVÍRUS ATRAVÉS DE RT-PCR .....	26
3.2.1	<b>Primers e controle positivo</b> .....	26
3.2.2	<b>Extração de RNA</b> .....	26
3.2.3	<b>Transcrição reversa (RT)</b> .....	27
3.2.4	<b>PCR e recuperação dos amplicons</b> .....	28
3.2.5	<b>Extração de DNA de gel de agarose</b> .....	29
3.2.6	<b>Sequenciamento de nucleotídeos</b> .....	30
3.2.7	<b>Alinhamento de sequências nucleotídicas</b> .....	31
3.2.8	<b>Análise Filogenética</b> .....	31
3.2.9	<b>Análises Evolutivas e de Polimorfismo</b> .....	33
3.2.10	<b>Análise estatística</b> .....	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	34

4.1	COLHEITA DE AMOSTRAS FECAIS .....	34
4.2	APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA A DETECÇÃO DE FRAGMENTOS GENÔMICOS DE ASTROVÍRUS BOVINO (BOASTV).....	35
4.3	SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS .	35
4.4	ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	36
4.5	ANÁLISES EVOLUTIVAS E DE POLIMORFISMOS .....	37
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>71</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 IMPORTÂNCIA E CARACTERÍSTICAS DO VÍRUS

A bovinocultura no Brasil é uma atividade altamente explorada, apresentando o segundo maior rebanho bovino do mundo, ficando somente atrás da Índia (FAO, 2013). Segundo dados oficiais apresentados para o ano de 2012, o rebanho brasileiro é de 211.279 milhões de cabeças (IBGE, 2012). Mundialmente, o Brasil também ocupa a segunda posição na produção de carne bovina, sendo os Estados Unidos o maior produtor (FAO, 2013). Logo a pecuária é parte da geração de riquezas do país com números altamente expressivos. Dessa forma, a viabilidade e competitividade do sistema de produção são diretamente ligadas à melhoria da produtividade e sanidade dos animais.

Vista como uma das principais enfermidades que acometem bezerros neonatos, a diarreia gera mundialmente perdas econômicas na pecuária bovina, devido às despesas com profissionais, custos de tratamento, redução das taxas de crescimento e mortalidade, constituindo um importante problema no setor (VIRTALA et al., 1996; BARRINGTON et al., 2002; KANEENE & HURD, 1990). Gastroenterites acometendo bovinos podem estar relacionadas a diversos enteropatógenos, a severidade eventualmente depende do agente causador podendo ser bacteriano, fúngico, viral, protozoário ou helmíntico (RADOSTITS et al., 2000). Em relação às ocorrências virais, as coronaviruses e rotaviruses são amplamente relacionadas à etiologia da diarreia, sobretudo em bezerros (ESTES, 1996; JEREZ, 1997). Todavia, a participação de outros agentes virais, como o astrovírus bovino, associado a infecções gastrointestinais nestes animais é relatado em alguns estudos (WOODE & BRIDGER, 1978; WOODE et al., 1984; TSE et al., 2011; OEM & AN, 2014).

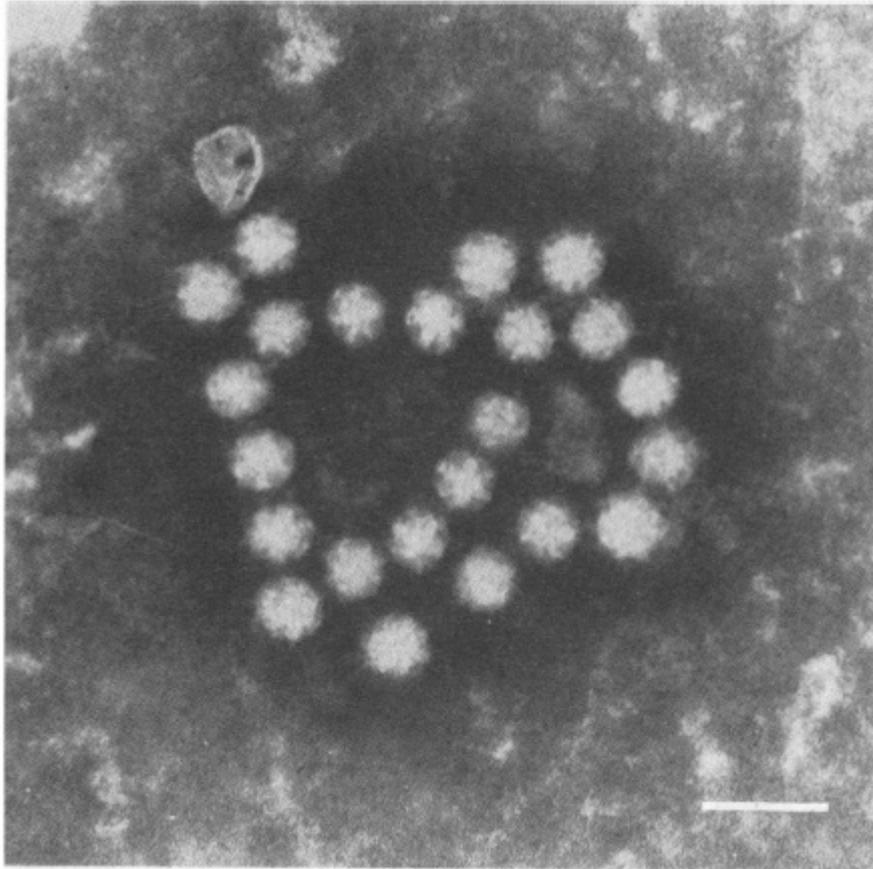
Os astrovírus (AstV) são vírus que infectam diversas espécies animais, estando associados a quadros gastroentéricos, sendo que o primeiro estudo de identificação deste agente data de 1975, a partir de um surto diarréico em crianças, numa maternidade no sul da Inglaterra (APPLETON & HIGGINS, 1975). Sintomas como vômito e diarreia são geralmente observados nas infecções por esses micro-organismos, variando de leve a grave

nas diferentes espécies de hospedeiros susceptíveis, porém as manifestações clínicas podem variar, não constituindo um padrão comum, sendo a transmissão entre as fontes de infecção e os suscetíveis caracterizada pela rota fecal-oral, incluindo consumo de água e alimentos contaminados (FLEET et al., 2000; LECLERC et al., 2002; MOSER & SCHULTZ-CHERRY, 2005; MÉNDEZ & ARIAS, 2007).

O astrovírus bovino (BoAstV) foi um dos primeiros astrovírus conhecidos entre os AstV mamíferos, detectado a partir de amostras de fezes de bezerros apresentando gastroenterite aguda provenientes de rebanhos ingleses, onde partículas denominadas de *small round viruses* (SRV), “astrovirus-like” e “calivirus-like” foram isoladas, tendo-se o primeiro relato do vírus no ano de 1978 (WOODE & BRIDGER, 1978). Posteriormente no ano de 1984, outro relato de isolamento de astrovírus em fezes de bezerro diarreico no estado da Flórida nos Estados Unidos foi relatado, relacionado antigenicamente com as cepas isoladas no Reino Unido (WOODE et al., 1984). No ano seguinte, baseado em resultados de um ensaio de neutralização foram estabelecidos dois sorotipos para o BoAstV (WOODE et al., 1985). Porém, depois desse período, poucos trabalhos foram publicados associados ao astrovírus bovino, sem novos relatos de identificação em outras regiões. Posteriormente, no ano de 2011, em Hong Kong (China), foram detectados 2 diferentes sorotipos a partir de 5 amostras positivas, completamente sequenciadas (TSE et al., 2011).

Em termos taxonômicos, os astrovírus (AstV) fazem parte da família *Astroviridae*, que por sua vez é dividida em dois gêneros: *Avastrovirus* e *Mamastrovirus*. O gênero *Mamastrovirus* abrange astrovírus que infectam mamíferos, particularmente bovinos, ovinos, felinos, suínos, lontras e humanos; enquanto o gênero *Avastrovirus* compreende os vírus que infectam aves, particularmente perus, patos e galinhas (WALTER & MITCHELL, 2003; LUKASHOV & GOUDSMIT, 2002; FAUQUET et al., 2005; KAPOOR et al., 2009).

Morfologicamente, à microscopia eletrônica das primeiras amostras virais analisadas, identificaram-se estruturas que conferiam à superfície da partícula viral aparência de estrelas de cinco a seis pontas (figura 1), contribuindo para a definição da nomenclatura desse grupo (MADLEY & COSGROVE, 1975). No entanto, estudos mais recentes mostram que somente aproximadamente 10% do total de amostras analisadas por microscopia apresentam tal forma, dificultando o estabelecimento de uma morfologia característica (MENDES & ARIAS, 2007; MATSUI & GREENBERG, 2001). São vírus não envelopados que possuem capsídeo icosaédrico com, no mínimo, três proteínas de 22 a 35 kilodaltons (kDa) na sua composição, com diâmetro da partícula entre 28 a 30 nanômetros (MENDES & ARIAS, 2007; BASS & QIU, 2000; MATSUI & GREENBERG, 2001).



Fonte: BRIDGER *et al.*, 1984.

Figura 1 - Microscopia eletrônica de amostra fecal de bezerro mostrando forma das partículas de BoAstV (barra = 50nm).

O genoma do AstV é composto por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA), de polaridade positiva (MOSER & SCHULTZ-CHERRY, 2005), contendo uma cauda poliadenilada na extremidade 3' (cauda Poli A) da fita, segmentos não codificantes (UTR) nas porções 3' e 5' e três *open reading frames* (ORFs): ORF1a, ORF1b e ORF2 (MATSUI *et al.*, 2001; LEWIS & MATSUI, 1995, 1996). Os genótipos conhecidos apresentam em média 6.800 nucleotídeos (MATSUI & GREENBERG, 2001); porém, sem contar a cauda poliadenilada, sua extensão pode variar de 6,4 até 7,3 kb, dependendo da estirpe considerada (KOCI *et al.*, 2003). As regiões da extremidade 5' do genoma, ORF1a e ORF1b codificam proteínas não estruturais que parecem estar envolvidas na replicação e transcrição do RNA, sendo que a ORF1a codifica a poliproteína não estrutural 1a, enquanto que a ORF1b codifica a poliproteína 1ab, que é expressa na junção ORF1a/1b através de um *frameshift* ribossomal que inclui uma RNA polimerase dependente (RdRp). A ORF2, na

extremidade 3', codifica as proteínas do capsídeo viral e é expressa a partir de RNA subgenômico, sendo responsável pela maior variabilidade detectada no genoma de AstV, contribuindo para a multiplicidade de estirpes patogênicas e determinando a principal indução à resposta por anticorpos específicos (KIANG & MATSUI, 2002; MÉNDEZ & ARIAS, 2007; PANTIN-JACKWOOD et al., 2011).

Em relação aos astrovírus bovinos (BoAstV), o conteúdo genômico de G+C varia de 53,3 a 54,3 mol%, enquanto que o genoma completo compreende 6253 a 6317 nucleotídeos (nt) em comprimento (TSE et al., 2011). A ORF1a codifica uma proteína de 90 kDa não estrutural e possui 2448-2454 nt de comprimento, enquanto a ORF1b completa é de 1566-1611 nt, a qual se sobrepõe a região ORF1a entre 102 a 147nt de comprimento. As ORF1a e ORF1b, quando analisadas conjuntamente, codificam a poliproteína não estrutural nsp1ab de massa molecular média de 147 kDa e que se torna ativa quando submetida à clivagem proteolítica pela protease viral 3C-like. Já ORF2 tem o comprimento médio de 2280-2319 nt, codificando proteínas estruturais na mesma fase de leitura que ORF1a, sendo a massa molecular total da proteína precursora de cerca de 83 - 84,5 kDa (figura 2) (TSE et al., 2011).



Fonte: Adaptado de TSE *et al.*, 2011.

Figura 2 - Representação esquemática do genoma de astrovírus bovino.

## 1.2 CULTIVO CELULAR E REPLICAÇÃO

A respeito do isolamento de AstV em cultivos celulares, a introdução de células de rim de embrião humano (HEK) na rotina laboratorial, permitiu o isolamento de AstV pela primeira vez no ano de 1981, com amostras provenientes de fezes, sendo adaptado em seguida a células de rim de macaco Rhesus (LLC-MK2) para difusão em linhagem contínua (KURTZ & LEE, 1984). Posteriormente, no ano de 1990 o astrovírus humano (HAstV) foi padronizado

com sucesso em linhagem celular a partir de células de adenocarcinoma coloretal humano (Caco-2), desde então vários avanços foram realizados em relação a caracterização do vírus (WILLCOCKS et al., 1990).

Entretanto, algumas espécies de astrovírus tem difícil crescimento em laboratório. Em decorrência dessa dificuldade, estudos de interação vírus-célula e produção de massa antigênica não podem ser realizados, prejudicando a classificação sorológica, a qual é geralmente baseada na similaridade de aminoácidos da região ORF2 e também nas porcentagens de nucleotídeos (KOCI et al., 2000; REUTER et al., 2011).

Para o cultivo de BoAstV em células embrionárias de rim de bovino, WOODE et al. (1984) relatam uma diminuição progressiva na quantidade de células infectadas, considerando cultivos secundários e terciários, comparativamente ao cultivo primário. Até o presente momento, nenhum relato de sucesso a respeito do cultivo celular do astrovírus bovino é descrito na literatura. A mais recente tentativa publicada data do ano de 2011, na qual pesquisadores utilizaram suabes originais com material fecal positivo para BoAstV visando o cultivo nas linhagens MDBK (células de rim de bovino) e Caco-2; porém, ambas as linhagens celulares não apresentaram efeito citopático. Reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) quantitativo também foi realizada empregando sobrenadantes da cultura e células lisadas para tentativa de identificação de replicação viral; contudo, não foram obtidos resultados positivos (TSE et al., 2011).

Quanto à cinética de replicação de AstV humano, a partir de ensaios imunoenzimáticos utilizando anticorpos específicos, as proteínas não estruturais podem ser detectadas após 6 horas da infecção do hospedeiro (MÉNDEZ & ARIAS, 2007). Uma característica destes agentes, é seu potencial de ação como uma enterotoxina através da proteína que compõe o capsídeo viral. MOSER et al. (2007) realizaram investigação demonstrando a capacidade do astrovírus em aumentar a permeabilidade da barreira epitelial, perturbando complexos de junções celulares, sugerindo que este fato pode contribuir com a diarreia. Todavia, o mecanismo que o astrovírus utiliza para induzir a diarreia não é completamente compreendido. Outras alternativas como a degradação do epitélio intestinal e modulação dos canais iônicos ou dissacarídeos intestinais levando a má absorção de nutrientes são imputadas. Contudo, o receptor de entrada do vírus é desconhecido (MOSER & SCHULTZ-CHERRY, 2005; DE BENEDICTIS et al., 2011).

Estudos *in vitro* conduzidos em células Caco-2 infectadas com HAstV-4 demonstraram que estes vírus induzem as células à apoptose (GUIX et al., 2004). Porém, estudos *in vivo* não demonstraram a associação de células mortas com o vírus (MOSER &

SCHULTZ-CHERRY, 2005). A propósito, segundo AROONPRASERT et al. (1989), a infecção celular pelo astrovírus bovino desencadeia a replicação da progênie no citoplasma, com posterior envolvimento de estruturas nucleares, particularmente o nucléolo; subsequentemente, as proteínas virais concentram-se inicialmente no perinúcleo, distribuindo-se posteriormente por todo o espaço citoplasmático.

Grandes divergências são descritas a respeito da gravidade infecciosa por astrovírus, o que pode ser devido à ausência de caracterização e estudos de caso. A carência de um modelo animal pode ser atribuída à falta de compreensão do ciclo do vírus no organismo, de modo que poucos estudos histopatológicos a respeito da patogênese e características histopatológicas de infecção em animais ou humanos estão descritos na literatura (MOSER & SCHULTZ-CHERRY, 2005).

### 1.3 HOSPEDEIROS

Em termos epidemiológicos, a diversidade de hospedeiros para os diferentes astrovírus já identificados era restrita até recentemente (MÉNDEZ & ARIAS, 2007). Contudo, uma grande amplitude de estirpes de AstV associadas a múltiplas espécies de mamíferos têm sido detectadas e caracterizadas nos últimos anos, principalmente através da utilização de técnicas moleculares como a PCR, aplicada especificamente para AstV ou em estudos metagenômicos (CHU et al., 2010; JONASSEN et al., 2001; KAPOOR et al., 2009; RIVERA et al., 2010; SMITS et al., 2010; TSE et al., 2011; ZHU et al., 2009). Nesse contexto, além das estirpes tradicionalmente conhecidas, novas espécies de AstV foram identificadas recentemente, estando associadas a cervídeos, leão marinho, golfinho, rato, cão e morcego, indicando uma alta diversidade de espécies hospedeiras (CHU et al., 2008; CHU et al., 2010; RIVERA et al., 2010; SMITS et al., 2010; TOFFAN et al., 2009).

Entre as espécies de AstV reconhecidas pelo Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus (*ICTV - International Committee for Taxonomy of Viruses*), os astrovírus humanos (HAstV), classificados em oito sorotipos, são utilizados em estudos de referência para a compreensão da estrutura e replicação do grupo (WALTER & MITCHELL, 2003; VICTORIA et al., 2007; DEY et al., 2010), sendo o tipo 8 amplamente estudado e o tipo 1 o

mais prevalente (MÉNDEZ-TOSS et al., 2000). O sequenciamento completo de HAstV-1 foi realizado no ano de 1994 (WILLCOCKS et al., 1994).

Recentemente, dois novos clados divergentes de astrovírus humanos foram identificados, o primeiro contendo AstV-MLB1, MLB-2 e MLB-3, e o segundo contendo AstV-VA1, VA2, VA3 e VA4, sendo ambos os clados associados a casos de gastroenterites com cepas obtidas a partir de amostras de fezes (FINKBEINER, 2009; FINKBEINER et al., 2008a; 2008b; 2009a; 2009b; JIANG et al., 2013).

Astrovirose é sugerida como a segunda causa mais comum de gastroenterite em crianças, ficando logo atrás das infecções por rotavírus (MATSUI & GREENBERG, 1996). Em crianças hospitalizadas e com diarreia, estudos comunitários demonstraram que a prevalência de HAstV varia de 2 a 16% (JEONG et al., 2012). Crianças menores de 2 anos de idade são as mais acometidas (MOSER & SCHULTZ-CHERRY, 2005).

Vários relatos de surtos em diferentes ambientes como asilos, creches, hospitais, escolas, entre outras localidades têm sido reportados ao redor do mundo, comprovando que HAstVs são patógenos mundialmente endêmicos (MITCHELL, 2002). Além da diarreia característica da infecção pelo vírus em humanos, também são observados sintomas como dor abdominal, dor de cabeça, leve desidratação e vômito (BON et al., 1999; DENNEHY et al., 2001).

Por outro lado, para os astrovírus caninos (CaAstV), pouco se conhece a respeito da epidemiologia envolvida, sendo que a primeira descrição data de 1980, através de estudos de microscopia eletrônica em fezes de filhotes, com posterior relato no ano de 1984, a partir de filhotes assintomáticos (WILLIAMS, 1980; MARSHALL et al., 1984; ZHU et al., 2009). Em tempo, até 2009, somente três sequências completas da ORF2 de CaAstV e uma sequência incompleta da ORF1b foram relatadas na literatura, e todas a partir de um mesmo foco na Itália (TOFFAN et al., 2009).

Em ovinos, a primeira infecção foi relatada em 1977, logo após a descoberta do astrovírus em humanos, e representa a primeira ocorrência do vírus em animais (SNODGRASS & GRAY, 1977). Cordeiros gnobióticos de 2 dias de idade infectados experimentalmente com astrovírus ovino (OAstV) apresentaram diarreia branda e amarelada 44 horas pós infecção, com sintomas desaparecendo poucos dias depois (SNODGRASS et al., 1979).

Já o astrovírus felino (FAstV) foi descrito pela primeira vez no ano de 1981 (HOSHINO et al., 1981). Partículas deste agente são detectadas em média em 10% dos casos de gatos diarreicos, onde os animais apresentam sintomas semelhantes às infecções de

astrovírus em humanos; porém, uma grande quantidade de vírus é excretada por aproximadamente 3% dos gatos saudáveis (MARSHALL et al., 1987).

Partículas de astrovírus oriundas de um surto de gastroenterite em camundongos foram detectadas através de ME em 1985. Entretanto, o vírus foi amplamente detectado em animais assintomáticos, sugerindo que os camundongos podem carregar o vírus latente e a doença surgir quando os animais estiverem imunocomprometidos (KJELDSBERG & HEM, 1985).

Em suínos, a primeira caracterização do astrovírus (PAstV), por microscopia eletrônica, ocorreu em 1980 (BRIDGER, 1980), sendo efetivamente isolado apenas em 1990 (SHIMIZU et al., 1990). Leitões infectados com (PAstV) desenvolvem sintomas semelhantes aos outros mamíferos, incluindo diarreia, anorexia e déficit de crescimento (BRIDGER, 1980). A exemplo dos CaAstV, poucas sequências genômicas completas ou parciais de PAstV foram publicadas, todas relacionadas a ORF2 (capsídeo) (JONASSEN et al., 2001; INDIK et al., 2006). Em estudo filogenético realizado na China, estirpes de PAstV circulantes foram agrupadas em diferentes clados, enquadradas em três linhagens diferentes, sendo que algumas cepas apresentaram maior similaridade com HAstVs, enquanto outras formavam um clado característico de PAstV e uma terceira linhagem apresentava maior associação com estirpes que infectam outros grupos de animais como ovelhas, leões marinhos e lontras, evidenciando possível transmissão viral interespecie de mamíferos para PAstV (DAOLIANG et al., 2011; LUO et al., 2011). A propósito, esses dados corroboram com outros estudos demonstrando que animais da mesma espécie podem ser infectados por estirpes de AstV de diferentes linhagens, de modo que os vírus de RNA tem uma tendência expressiva à variabilidade genética, dada a natureza da RNA polimerase dependente de RNA que é passível ao erro na polimerização da cadeia nascente e pode transcrever numa única cópia fragmentos de cadeias-moldes de RNA distintas. Devido à recombinação genética e mutações, a variabilidade do genoma dos astrovírus mais pesquisados é descrita em várias publicações como: RatAstVs (CHU et al., 2010), PoAstVs (LUO et al., 2011), BatAstVs (CHU et al., 2008; DREXLER et al., 2011), BoAstVs (TSE et al., 2011), CAstV (PANTIN-JACKWOOD et al., 2011) e perus (FU et al., 2009). Apesar disso, nenhuma transmissão interespecie foi relatada envolvendo seres humanos; contudo, o potencial de transmissão é definido por vários autores (LUKASHOV & GOUDSMIT, 2002; LUO et al., 2011; CHU et al., 2010).

Em aves, o vírus da nefrite aviária em galinhas (ANV), que causa lesões renais, diminuição do crescimento e ocasionalmente pode levar à morte, bem como o agente da hepatite fatal em patos, conhecido como vírus da hepatite tipo 2 (DVH2), são astrovírus que

não estão diretamente relacionados a gastroenterites (GOUGH, 1984; IMADA et al., 2000). Contudo, o astrovírus das galinhas (CAstV) é capaz de provocar diarreia branda e distensão do intestino delgado, conforme resultados de infecção experimental em pintos de um dia, sendo genética e antigenicamente distinto do ANV, demonstrando que o astrovírus pode se manifestar em alguns casos em locais não associados ao trato gastrointestinal (BAXENDALE & MEBATSION, 2004). Nesse contexto, recentemente uma nova causa de doença neurológica, potencialmente relacionada ao astrovírus bovino, foi detectada, sendo o agente denominado BoAstV-NeuroS1; esse vírus foi encontrado em tecido cerebral de animais com desordem neurológica de etiologia desconhecida, histologicamente caracterizada como ganglioneurite e meningoencephalomyelite; a cepa foi filogeneticamente relacionada com astrovírus de ovino; entretanto, os animais estudados não apresentavam sintomas de infecção intestinal (LI et al., 2013). Além do astrovírus bovino recentemente relacionado à doença do sistema nervoso central, astrovírus associado a encefalite foi também identificado em criança imunodeficiente e em vison americano apresentando desordens neurológicas (BLOMSTRÖM et al., 2010; QUAN et al., 2010).

Estudos relacionando bovinos sofrendo gastroenterites demonstraram que a replicação de BoAstV em bezerros é normalmente detectada em 1 a 3 dias pós-infecção e localizada nas células do íleo sobre as placas de Peyer, disseminando-se eventualmente para as bases das vilosidades vizinhas. Como consequência, lesões intestinais brandas e ainda espessamento de vilosidades com pequena atrofia também são observadas (WOODE & BRIDGER, 1978; WOODE et al., 1984). A excreção de partículas de BoAstV por bovinos saudáveis e infectados ocorre entre 60% a 100% dos animais, dentro das 5 primeiras semanas de vida (BRIDGER et al., 1984). Em termos clínicos, as infecções são muitas vezes assintomáticas e resultados de investigações associando a virulência das estirpes com grau de patogênese ainda são inconclusivos (WOODE et al., 1984); no entanto, estudos têm indicado que o BoAstV quando associado a outros agentes virais entéricos, a exemplo dos rotavírus e norovírus, agrava o quadro clínico, intensificando o grau das lesões encontradas. Não obstante, em infecções apenas por BoAstV de bezerros gnotobióticos recém-nascidos de até 42 dias de vida, alterações são notadas na consistência e coloração das fezes indicando que o BoAstV é capaz de determinar a enterite clinicamente identificável (BRIDGER et al., 1984).

Compreensivelmente, maiores estudos de vigilância em larga escala de BoAstV em rebanhos comerciais são necessários para a melhor caracterização da epidemiologia desse agente etiológico (TSE et al., 2011). Em termos de relevância da exequibilidade e urgência de investigações epidemiológicas sobre astrovírus bovino no Brasil, é conveniente destacar

que não há estudo algum publicado na literatura pertinente. Nesse contexto, LAURIN et al. (2011) destacam que investigações direcionadas à detecção e estudo da diversidade de AstV em animais de produção e selvagens contribuem preponderantemente para a identificação precoce e análise do risco de surtos emergentes, permitindo intervenções mais rápidas e precisas para o controle da disseminação das doenças associadas. Nesse sentido, HOET et al. (2002) enfatizam que o principal elemento para o estabelecimento de medidas de prevenção e controle da diarreia é a detecção e reconhecimento de novos ou emergentes patógenos que podem afetar a saúde e o desenvolvimento de animais de produção, subsidiando a compreensão de suas características epidemiológicas.

## 2 OBJETIVOS

Nesse contexto, tendo-se em vista a necessidade de estudos envolvendo a possível circulação de astrovírus 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. Formar um banco de amostras fecais bovinas, a partir de animais diarreicos e sadios, de diferentes idades, provenientes de rebanhos leiteiros e de corte, das regiões centro-sul e norte do Brasil;
2. Aplicar a técnica de RT-PCR para a detecção de sequências genômicas específicas de BoAstV, relativas ao gene *pol*, a partir de amostras fecais coletadas;
3. Realizar o sequenciamento nucleotídico dos fragmentos genômicos detectados e posterior análises filogenética, evolutivas e de polimorfismos baseadas nas sequências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidas entre as sequências obtidas bem como daquelas de outras variantes de BoAstV depositadas em banco de dados.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLHEITA DE AMOSTRAS FECAIS

Os procedimentos de coleta de amostras fecais foram realizados conforme recomendam HOET et al. (2003). Foi formado um banco de amostras contendo 272 amostras fecais de bovinos diarreicos e sadios, colhidas de rebanho leiteiro 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, para uma maior dimensão da amplitude de distribuição desse vírus, refletindo diretamente sobre a epidemiologia e determinação da possível importância desse agente na etiologia da diarreia em bovinos nessas distintas regiões. Parte das amostras foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Maria da Glória Buzinaro do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV–UNESP/Jaboticabal). Os animais foram classificados quanto ao sexo, raça, idade e aptidão no qual foram divididos em três categorias: bezerros ( $\leq 6$  meses), jovens ( $\leq 2$  anos) e adultos ( $> 2$  anos). As amostras fecais, coletadas diretamente do reto, foram acondicionadas em sacos plásticos individuais e mantidas sob-refrigeração (banho de gelo) até ao 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 ( $8000 \times g$ , 20 min, 4°C); os sobrenadantes foram colhidos e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

## 3.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DAS INFECÇÕES POR ASTROVÍRUS ATRAVÉS DE RT-PCR

### 3.2.1 Primers e controle interno

Os primers foram selecionados para a amplificação de fragmento genômico do gene *pol* de BoAstV, de acordo com as recomendações de TSE et al. (2011), em reações de RT-PCR, 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 astrovírus bovino.

Nome	Orientação	Sequência (5'-3')	Gene	Produto (bp)
BoAstV-F	senso	GAYTGGACBCGHTWTGATGG	<i>pol</i>	432
BoAstV-R	antissenso	KYTTRACCCACATNCCAA	<i>pol</i>	
Actin-F	senso	ACCAGCCATCCAGACAAAAC	Actina bovina	360
Actin-R	antissenso	ATCTTCAGGGACTTTGGACG	Actina bovina	

Fonte: TSE et al. (2011); RENSCHAW et al. (2000).

### 3.2.2 Extração de RNA

Alíquotas de 300 microlitros ( $\mu\text{L}$ ) 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 ( $\mu\text{g/mL}$ ) do RNA obtido para cada amostra por espectrofotometria (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, GE Healthcare, 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 $\mu$ g 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<sup>TM</sup> Reverse Transcription System (Promega, EUA), segundo as recomendações do fabricante. Em linhas gerais, em microtubo livre de nucleases, foram adicionados 4,0 $\mu$ L de cada amostra de RNA extraído e 1,0 $\mu$ L do primer senso específico para as reações de RT-PCR (Actin-F ou BoAstV-F) a 10 micromolar ( $\mu$ M). 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 em ordem, 3,2  $\mu$ L de água livre de nucleases, 4 $\mu$ L do tampão ImProm-II<sup>TM</sup> 5X Reaction Buffer, 4,8 $\mu$ L de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 1 $\mu$ L de conjunto de nucleotídeos: adenina, citosina, timina, guanina (dNTP Mix), 1 $\mu$ L de Recombinant RNasin<sup>®</sup> Ribonuclease Inhibitor e 1 $\mu$ L de enzima ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase. A mistura, totalizando 20 $\mu$ L, foi homogeneizada e colocada em termociclador, seguindo um protocolo consistindo de 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C 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<sup>®</sup> Colorless Master Mix (Promega, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Em síntese, 3µL do produto da transcrição reversa (cDNA) foi misturado com 12,5µL de GoTaq<sup>®</sup> Colorless Master Mix 2X, 1,0µL do primer senso específico (Actin-F ou BoAstV-F) a 10µM, 1,0µL do primer antissenso específico (Actin-R ou BoAstV-R) a 10µM e 7,5µL de água livre de nucleases (GE Healthcare, EUA) totalizando 25µL. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de água livre de nucleases.

O protocolo de termociclagem empregado (Swift<sup>™</sup> MaxPro Thermal Cycler, Esco Technologies Inc., EUA), visando à amplificação do fragmento genômico viral de BoAstV, compreendeu: incubação a 94°C por 7 min., e, em seguida, 50 ciclos de 94°C por 1 min., 48°C por 1 min. e 72°C por 1 minuto, sendo a extensão final dada a 72°C por 10 minutos, consoante recomendam TSE et al. (2011). 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 8µL por amostra, adicionado de um volume de 2µL de uma solução contendo 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,3% (w/v) de azul de bromofenol e 65% (p/v) de sacarose, pH=7,5, (BlueJuice<sup>®</sup> Gel Loading Buffer, Life Technologies, EUA). Na sequência, o gel foi submetido à coloração em solução de SYBR<sup>®</sup> 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 pares de base (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 100mg do gel de agarose deve-se acrescentar 100µL de Buffer NT tipo 3, primeiro reagente utilizado no protocolo de extração. Uma vez adicionado o tampão NT, as amostras foram incubadas em 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 colocada em coluna com membrana de sílica do illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, apoiada em tubo coletor, incubada por 1 minuto em temperatura ambiente e submetida à centrifugação por 30 segundos a  $11.000 \times g$ , em 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  $11.000 \times g$  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  $11.000 \times g$  durante 30 segundos, a fim de se remover o tampão Wash Buffer tipo 1 completamente.

Por fim, o DNA foi eluído com 18µL do tampão Elution Buffer tipo 6 em microtubo estéril de 1,5mL, deixando-se, inicialmente, a coluna em repouso, após a adição do eluente, em temperatura ambiente por 1 minuto, sendo, na sequência, submetida à centrifugação por  $11.000 \times g$ , durante 1 minuto, em temperatura ambiente. O DNA obtido para cada amostra através do procedimento de extração de DNA de géis de agarose foi devidamente quantificado nanograma/microlitro (ng/µL) por espectrofotometria (GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator, GE Healthcare, EUA), segundo a razão de absorbância  $A_{260}/A_{280}$ , com o intuito de se determinar a quantidade de DNA em cada amostra, uma vez que, para a realização do sequenciamento dos fragmentos genômicos obtidos, as amostras testadas precisam apresentar concentração mínima de DNA de 20ng/µL. Adicionalmente à

quantificação por espectrofotometria, as concentrações de DNA das amostras positivas, foi realizada a eletroforese em gel de agarose utilizando-se marcador de massa molecular (Low DNA Mass™ Ladder, Life Technologies, EUA) para estimativa da quantidade de DNA dos fragmentos genômicos obtidos. Para tanto, os amplicons obtidos na extração de DNA a partir de gel de agarose foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris Acetato/EDTA (TAE 1X), num volume de 4µL por amostra, adicionado de um volume de 1µL de uma solução contendo 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0,3% (w/v) de azul de bromofenol e 65% (p/v) de sacarose, pH=7,5 (tampão de carregamento) (BlueJuice™ Gel Loading Buffer, Life Technologies, EUA). O marcador de massa molecular foi também utilizado num volume de 4µL com 1µL do tampão de carregamento, volumes idênticos aos aplicados às amostras para uma confiável estimativa da massa molecular dos amplicons 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 realizadas 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'. Alinhamentos para as sequências deduzidas de aminoácidos também foram igualmente realizados. Matrizes de distâncias, dadas em porcentagens de similaridade/identidade, entre as sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidas foram calculadas através do programa MatGAT versão 2.0 (CAMPANELLA et al., 2003), utilizando algoritmo de alinhamento global.

### 3.2.8 Análise Filogenética

Reconstruções filogenéticas para sequências de 432 nucleotídeos, relativas ao gene *pol*, bem como as deduzidas de aminoácidos correspondentes foram realizadas através do método *Neighbor-Joining* (NJ), utilizando-se para tanto dos modelos de substituição TN93 (Tamura-Nei, 1993) + G (distribuição gama,  $\alpha=0,63$ ) (nucleotídeos) e JTT (Jones-Taylor-Thornton, 1992) + G (distribuição gama,  $\alpha=0,66$ ) (aminoácidos) com suporte nodal de *bootstrap* para 1000 pseudo-réplicas através do programa MEGA 5.0 (KUMAR et al., 1994), sendo as matrizes de substituição para nucleotídeos e deduzidas de aminoácidos obtidas, respectivamente, através dos programas MEGA 5.0 (KUMAR et al., 1994) e ProtTest 2 (ABASCAL et al., 2005). Para as reconstruções foram utilizadas outras sequências de astrovírus depositadas no GenBank, conforme indicado na tabela 2.

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

<b>Genótipo</b>	<b>Nome</b>	<b>Origem</b>	<b>Nº acesso Genbank</b>
HAstV	176	China	FJ755403
HAstV	Astrovirus 4	China	DQ344027
HAstV	Type 4	Alemanha	AY720891
HAstV	HUN4520	Hungria	HQ398856
HAstV	128	China	FJ755402
HAstV	GO/12/95	Brasil	DQ070852
HAstV	GO/12/94	Brasil	DQ028633
HAstV	Nsc08-3364	Russia	GU732187
HAstV	Nsc09-B4	Russia	GQ901902
CAstV	4175	E.U.A	JF832365
Baleia de minke AstV	MH03-629	E.U.A	HQ668143
PAstV	17-4	Canadá	HM756270
PAstV	2	Hungria	GU562296
PAstV	11-2	Canadá	HM756266
PAstV	15-2	Canadá	HM756268
PAstV	18-5	Canadá	HM756271
PAstV	10-4	Canadá	HM756265
PAstV	19-3	Canadá	HM756272
PAstV	13-1	Canadá	HM756267
PAstV	20-5	Canadá	HM756273
PAstV	15-6	Canadá	HM756269
BoAstV	B34/HK	China	HQ916315
CcAstV	1/DNK	Países Baixos	HM447045
BoAstV	B18/HK	China	HQ916313
BoAstV	B76-2/HK	China	HQ916317
BoAstV	B161-2	China	JF796127
CcAstV	2/DNK	Países Baixos	HM447046
BoAstV	B76/HK	China	HQ916316
BoAstV	B170/HK	China	HQ916314
BoAstV	B161-1	China	JF796126
Morcego AstV	DX14	China	FJ571090
Morcego AstV	LD38	China	FJ571065
Morcego AstV	LD154	China	FJ571127
Morcego AstV	LD16	China	FJ571107
Morcego AstV	AFCD329	China	EU847204
Morcego AstV	HK61	China	HQ613174
Morcego AstV	HK63	China	HQ613175
Morcego AstV	Sy18	China	HQ613164

### 3.2.9 Análises Evolutivas e de Polimorfismo

Análise de pressão de seleção sobre as sequências nucleotídicas codon-alinhadas foi baseada no modelo *random effects branch site* (Branch-site REL) (POND et al., 2011), utilizando-se o modelo de substituição TN93 e árvore filogenética inicial pelo método NJ, enquanto a análise de recombinação foi testada através do método *recombination using genetic algorithm recombination detection* (GARD) (POND et al., 2011), com árvore filogenética inicial pelo método NJ. Ambas as análises foram realizadas no Data Monkey web server (DELPOR et al., 2010).

Análise gráfica *sliding-window* para verificação de pressão seletiva com base na razão entre o número de substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimo ( $K_a$ ) e o número de substituições sinônimas por sítio sinônimo ( $K_s$ ) ( $\omega$  ou  $K_a/K_s$ ) foi realizada através do programa DnaSP versão 4.5 (ROZAS et al., 2003).

### 3.2.10 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). Os métodos Branch-site REL e GARD foram realizados com suporte estatístico Bayesiano. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 COLETA DE AMOSTRAS FECAIS

Coletas de amostras fecais foram realizadas, no total, em 272 bovinos provenientes de rebanhos leiteiros e de corte. A figura 3 ilustra a localização dos municípios onde foram realizadas as coletas de material, pertencentes aos estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rondônia, Paraná e Rio Grande do Sul. O apêndice (quadro 5) apresenta a relação dos 272 animais amostrados 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, 201 (73,9%) eram bezerros ( $\leq 6$  meses), 54 (19,9%) eram jovens ( $\leq 2$  anos) e 17 (6,2%) eram adultos ( $> 2$  anos). Os bovinos apresentando aptidão para leite totalizaram 203 animais (74,6%), enquanto que 69 (25,4%) eram provenientes de rebanho para corte. Animais mestiços totalizaram 100 (36,8%) bovinos, enquanto 168 animais (61,8%) pertenciam à raça holandesa e 4 animais (1,4%) eram da raça angus. Os machos perfizeram 76 animais (27,9%), enquanto que 196 (72,1%) fêmeas foram amostradas. Animais criados em regime extensivo de produção totalizaram 69 bovinos (25,4%), enquanto que o restante 203 animais (74,6%) estavam sob sistema semi-intensivo ou intensivo de produção. Em relação à ocorrência ou não de diarreia, 122 animais (44,8%) apresentaram um quadro diarreico, sendo que com exceção de 2 animais que se enquadravam na categoria de bovinos adultos  $> 2$  anos, o restante pertencia à categoria de bezerros, ou seja, possuíam  $\leq 6$  meses de vida.

## 4.2 APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE RT-PCR PARA A DETECÇÃO DE FRAGMENTOS GENÔMICOS DE ASTROVÍRUS BOVINO (BoAstV)

Do total de 272 amostras fecais, 39 animais foram considerados positivos ao RT-PCR para astrovírus bovino, com a amplificação de fragmento do gene *pol* de tamanho 432bp perfazendo, no total, uma positividade de 14,3% (39/272) entre os animais (quadro 1).

Das amostras positivas, todas eram originárias de bezerros (97,4%) exceto um animal que era jovem (2,6%). Quanto ao sexo, a maior parte dos animais eram fêmeas 26 (66,7%) e 13 (33,3%) machos. Vinte e cinco animais (64,1%) apresentavam quadro de diarreia, enquanto quatorze (35,9%) não apresentavam ( $P < 0.05$ ). Todos apresentavam aptidão leiteira (84,6%), exceto seis (15,4%) que apresentavam aptidão para corte.

As amostras positivas para BoAstV seguiram a seguinte distribuição: 21 amostras (53,8%) oriundas do estado de São Paulo, 14 amostras (35,9%) do estado de Minas Gerais, 2 amostras (5,1%) do estado de Goiás, 1 amostra (2,6%) de Mato Grosso do Sul e 1 amostra (2,6%) do estado do Rio Grande do Sul (figura 4).

## 4.3 SEQUENCIAMENTO NUCLEOTÍDICO E ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS

Do total de 39 amostras positivas ao 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: 20ng/ $\mu$ L, segundo a razão de absorbância  $A_{260}/A_{280}$ ). Este fato pode ter ocorrido devido à baixa concentração viral nas fezes ou ainda pela degradação do RNA viral em consequência do tempo de armazenamento das amostras em questão.

Das 11 amostras de BoAstV sequenciadas, 7 amostras eram provenientes do estado de São Paulo (4, 65, 75, 155, 188, 199 e 267), 3 de Minas Gerais (43, 239 e 254) e 1 amostra do estado de Rio Grande do Sul (202). As amostras sequenciadas foram enviadas ao banco de dados GenBank e suas respectivas identificações podem ser observadas no quadro 2.

As porcentagens de similaridade de aminoácidos obtidas entre as amostras de BoAstV sequenciadas foram maiores do que 86,8%, quando comparadas umas com as outras, enquanto que com relação às amostras de referência de BoAstV, recuperadas do GenBank, as amostras obtidas no presente trabalho apresentaram similaridade variando de 86,2 a 94,8% e identidade variando de 68,1 a 87,9%. A amostra BoAstV-155-BRA, oriunda do animal de cadastro nº 155 (apêndice - quadro 5), apresentou maior similaridade/identidade com a sequência CcAstV-1, detectada em cervídeos, bem como a maior parte das sequências de BoAstV encontradas no GenBank.

Os quadros 3 e 4 elencam as porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências de aminoácidos e nucleotídeos entre 5 amostras sequenciadas e sequências de referência para astrovírus depositadas no GenBank.

#### 4.4 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As figuras 10 e 11 ilustram os cladogramas obtidos das reconstruções filogenéticas de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente, para as sequências de astrovírus. Em linhas gerais, as amostras sequenciadas no presente estudo, excetuando-se as amostras BoAstV-155-BRA e BoAstV-267-BRA, foram agrupadas em subclado único dentro do clado de astrovirus bovinos (BoAstV), quando considerada a reconstrução filogenética baseada nas sequências deduzidas de aminoácidos, estando, no entanto, distribuídas em 2 clados parafiléticos, quando consideradas as sequências nucleotídicas com valor de *bootstrap* significativo (>70%) (figura 10), sendo um deles formado unicamente pela amostra BoAstV-43-BRA. Por outro lado, a amostra BoAstV-155-BRA foi agrupada em clado abrangendo outros astrovírus bovinos e de cervídeos (CcAstV-1 e CcAstV-2), tanto na reconstrução baseada nas sequências de nucleotídeos como na deduzida de aminoácidos, enquanto que a amostra BoAstV-267-BRA, para ambas as reconstruções, apresentou posição mais basal aos clados que envolvem as amostras referentes a astrovirus bovinos, suínos e de cervídeos, com alto valor de bootstrap associado (93%) quando considerada a reconstrução baseada nas sequências de nucleotídeos (figura 10).

## 4.5 ANÁLISES EVOLUTIVAS E DE POLIMORFISMOS

O padrão divergente de localização das amostras BoAstV-155-BRA e BoAstV-267-BRA nas reconstruções filogenéticas obtidas não foi resultante nem da ação de episódios de seleção positiva, nem de recombinação, quando realizada análise do ramo correspondente a cada amostra. Porém, quando considerados os cladogramas como um todo, nucleotídeos localizados em 13 códons diferentes indicaram ocorrência de seleção positiva ( $\omega > 1$ ), enquanto 89 sítios localizados em 89 códons diferentes exibiram padrão de seleção negativa ( $\omega < 1$ ).

Não obstante, considerando as amostras BoAstV-155-BRA e BoAstV-267-BRA, a razão  $Ka/Ks$  ( $\omega$ ) não foi uniforme ao longo de ambas as sequências, tendo alcançado valores  $\omega > 1$  nas extremidades 3' dos respectivos fragmentos, conforme ilustrado na figura 12 (seções B e D), quando comparadas com todas as sequências de BoAstV utilizadas na análise filogenética. A amostra BoAstV-155-BRA também apresentou perfil de variação relativamente semelhante (figura 12A) quando comparadas com as demais amostras BRA, diferindo nessa comparação da amostra BoAstV-267-BRA cujos valores de  $Ka/Ks$  não ultrapassaram 0,956 (figura 12C).

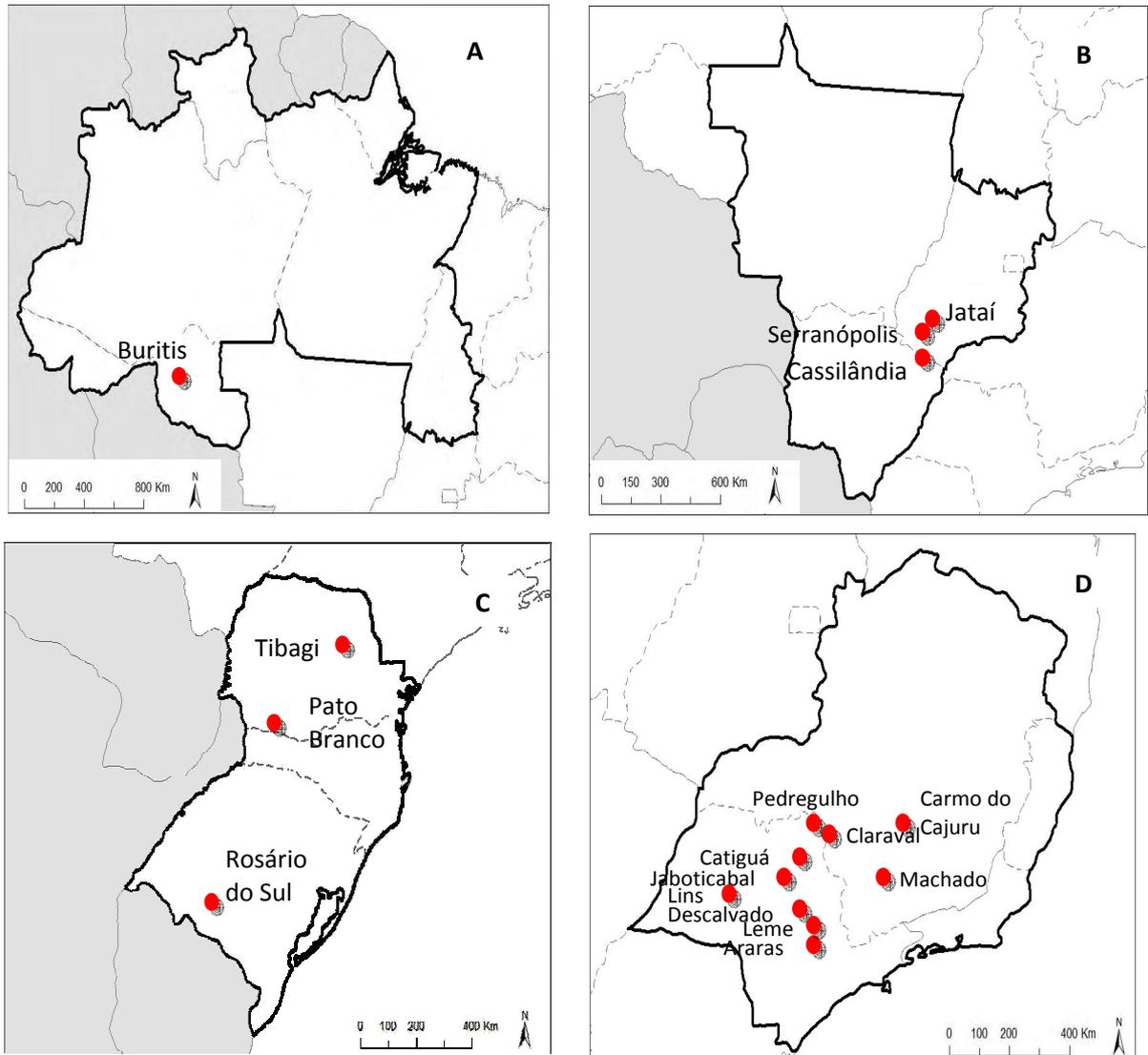


Figura 3 - Localização geográfica dos municípios onde foram realizadas coletas das amostras bovinas de fezes nas regiões Norte (A), Centro-Oeste (B), Sul (C) e Sudeste (D) do Brasil (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2011).

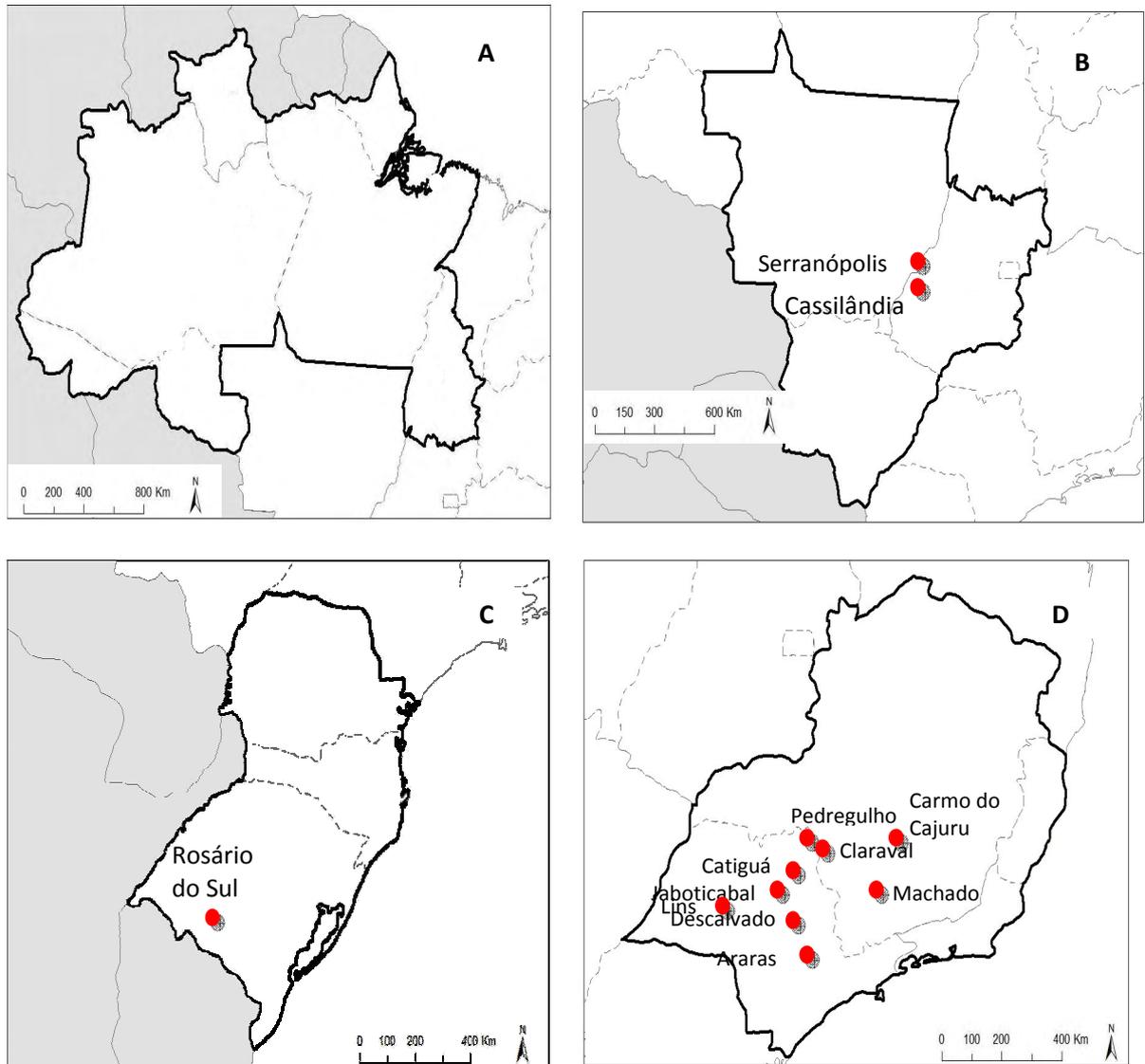


Figura 4 - Localização geográfica dos municípios onde foram coletadas as amostras positivas para BoAstV, nas regiões Centro-Oeste (B), Sul (C) e Sudeste (D) do Brasil. Na região Norte, não foram detectadas amostras positivas (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, 2011).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
4	Macho da Picanha	2 meses	M	Leite	Mestiço (holandês-girnelore) / Sistema semi-intensivo	Pedregulho-SP	03/07/07		X
42	74	35 dias	F	Corte	Mestiço (guzerá, canchim e red angus) / Sistema extensivo	Claraval-MG	17/09/07		X
43	52	35 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
65	1349	3 meses e 18 dias	M	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema intensivo (vacas e bezerras) e semi-intensivo (novilhas)	Jaboticabal-SP	28/09/07		X
75	1355	1 mês e 27 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
97	1151	6 meses	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema intensivo (vacas e bezerras); Sistema semi-intensivo (novilhas)	Machado-MG	07/12/07		X
114	733	8,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
143	39/08	15 dias	M	Corte	Mestiço (nelore, guzerá/Sistema extensivo)	Catiguá-SP	14/07/08	X	

Quadro 1 - Relação dos animais amostrados e positivos para BoAstV através de RT-PCR, segundo as características investigadas (continua).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
151	77/08	46-60 dias	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistemas intensivo e semi- intensivo	Jaboticabal-SP	03/09	X	
153	79/08	46-60 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
154	80/08	46-60 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
155	81/08	46-60 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
157	83/08	46-60 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
163	195/08	1-5 dias	M	Corte	Mestiço (Sistema extensivo)	Cassilândia- MS	04/09	X	
175	285/08	16-20 dias	M	Corte	Angus (Sistema extensivo)	Serranópolis- GO	idem	X	
177	288/08	16-20 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
180	GUI	20 dias	M	Leite	Holandês preto e branco/sistema semi- intensivo	Descalvado-SP	17/1/2012	X	
185	5187	14 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
188	3477	10 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	

Quadro 1 - Relação dos animais amostrados e positivos para BoAstV através de RT-PCR, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
189	5177	17 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
190	4945	16 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
192	5163	24 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
194	UVA 193	10 dias	M	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema semi-intensivo	Araras-SP	28/02/2012	X	
196	ABACATE 195	26 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
198	ARROZ 197	10 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
199	SEU HUDSON 198	10 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
202	03	30 dias	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema semi-intensivo	Rosário do Sul/RS	20/10/2009	X	
229	S61	60 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010		X
230	S62	60 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
231	S63	60 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
232	S64	60 dias	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 1 - Relação dos animais amostrados e positivos para BoAstV através de RT-PCR, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarréia	
								Sim	Não
233	S65	60 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
234	S66	60 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
239	571	60 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010		X
246	526	45 dias	M	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	idem	X	
249	529	60 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
254	534	1 semana	M	idem	idem	idem	idem	X	
266	688	15 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Lins/SP	18/07/2010	X	
267	689	15 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	

M= Masculino F= Feminino Idem= Idêntico

Quadro 1 - Relação dos animais amostrados e positivos para BoAstV através de RT-PCR, segundo as características investigadas (conclusão).

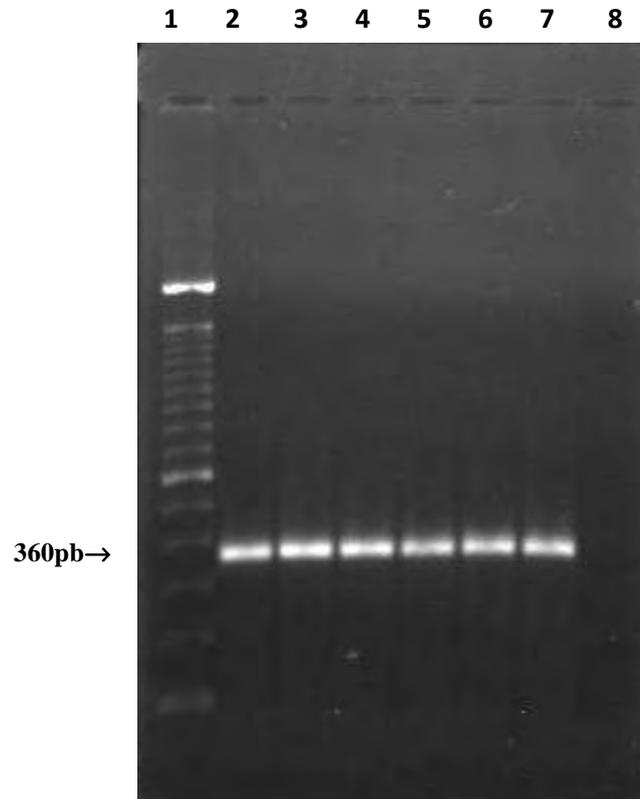


Figura 5 - Fotografia de gel de agarose corado com SYBR<sup>®</sup> Gold, sob luz UV, ilustrando amplicons obtidos para actina bovina como controle interno a partir da técnica de RT-PCR, utilizando extração de RNA com TRIZOL<sup>®</sup>. As amostras fecais de bovinos foram aleatoriamente selecionadas do banco de amostras (apêndice - quadro 5). (1) Marcador de peso molecular de 100bp. (2) Amostra 161. (3) Amostra 171. (4) Amostra 172. (5) Amostra 208. (6) Amostra 267. (7) Amostra 212. (8) Controle negativo “água”.

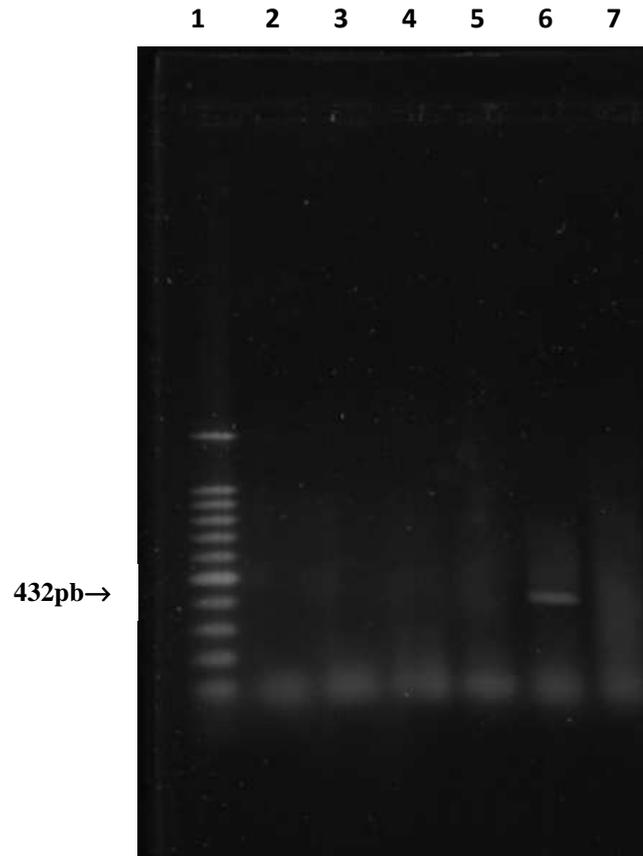


Figura 6 - Fotografia de gel de agarose corado com SYBR<sup>®</sup> Gold, sob luz UV, ilustrando resultado de amplificação de fragmentos de 432bp, relativo ao gene *pol* do genoma de BoAstV, após aplicação das técnicas de RT-PCR, a partir de amostras fecais bovinas. (1) Marcador de peso molecular de 100bp. (2) Amostra 161. (3) Amostra 171. (4) Amostra 172. (5) Amostra 208. (6) Amostra 267. (7) Amostra 212.

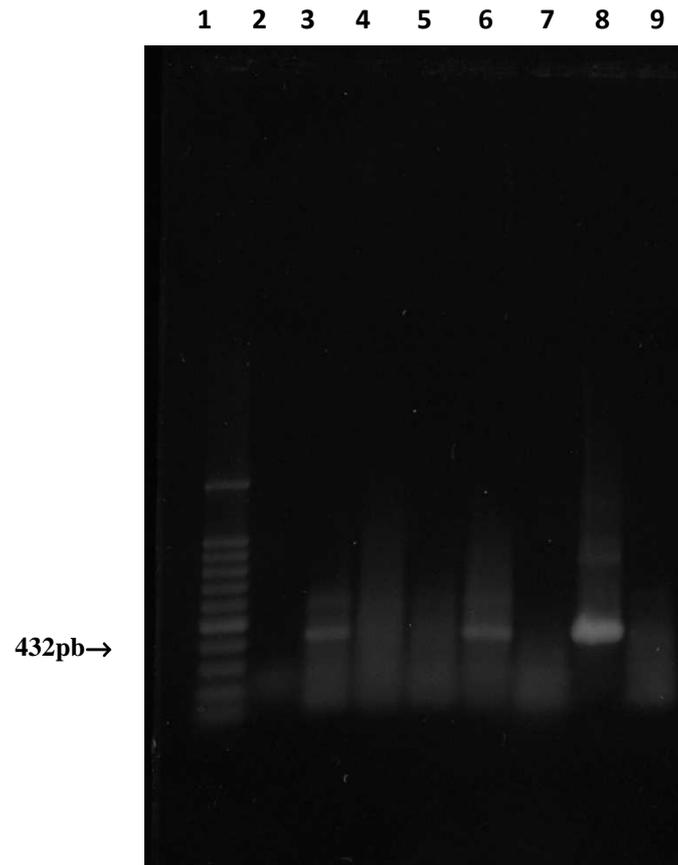


Figura 7 - Fotografia de gel de agarose corado com SYBR® Gold, sob luz UV, ilustrando resultados de amplificação de fragmentos de 432bp, relativo ao gene *pol* de astrovírus bovino, obtidos através das técnicas de RT-PCR a partir de amostras fecais bovinas. (1) Marcador de peso molecular de 100bp. (2) Controle negativo “água”. (3) Amostra 163. (4) Amostra 121. (5) Amostra 174. (6) Amostra 199. (7) Amostra 271. (8) Amostra 65. (9) Amostra 156.

<b>Amostra</b>	<b>Código de acesso GenBank</b>
BoAstV-4-BRA	KJ633793
BoAstV-43-BRA	KJ633790
BoAstV-65-BRA	KJ633794
BoAstV-75-BRA	KJ633795
BoAstV-155-BRA	KJ633791
BoAstV-188-BRA	KJ596489
BoAstV-199-BRA	KJ633796
BoAstV-202-BRA	KJ633792
BoAstV-239-BRA	KJ633797
BoAstV-254-BRA	KJ633798
BoAstV-267-BRA	KJ633799

Quadro 2 - Amostras positivas e sequenciadas de astrovírus bovino detectadas no presente trabalho, e depositadas no GenBank com seus respectivos códigos de acesso.

	10	20	30	40	50	60	70	80
BoAstV-4-BRA	GAAATAAATAAGACCACCGGAAAGAT	ATAGGCATGTCATGACTGGTACGTAGAGAA	TTTGCTTACCCGCTACGT					
BoAstV-267-BRA	GAGATGTGCCCTGAACACCGTGAGCGCT	ACCGCGGATACCGGATTTGGTATGTGGCCAACTTACTCACGCCACGT						
BoAstV-43-BRA							CTGCTGATTGGCCATGT	
BoAstV-65-BRA	GAAATTAATAAGGATCACCAGGAAAGGT	ATAAGCATGTCATGATTGGTACGTAGAGAA	TTTGCTTACCCGCTATGT					
BoAstV-75-BRA	GAAATTAATAAGGATCACCAGGAAAGGT	ATAAGCATGTCATGATTGGTACGTAGAGAA	TTTGCTTACCCGCTATGT					
BoAstV-155-BRA	GAGATCAACAAGCAGCACAGAGAGAT	ACAGGCACGTTCCATGAAATGGTACGTGCAGAACTTCTCACAAGGTACGT						
BoAstV-188-BRA	AAGATAAATAAGACCACCGGAGAGGT	ATAGACATGTACATAATGGTACGTAGAGAACTTGGCTTACCCGCTACGT						
BoAstV-199-BRA	GAAATCAACAAAGAGCACCGGAGAGGT	ATAGGCATGTACATGAATGGTACGTAGAGAA	TTTGCTTACCCGCTACGT					
BoAstV-202-BRA	GAAATCAACAAAGAGCACCGGAAAGAT	ATAGGCATGTACATGATTGGTACGTAGAGAA	TTTGCTTACCCGCTATGT					
BoAstV-239-BRA	GAAATAAATAAGAGCACCGGAGAGAT	ATAGACATGTGCATGACTGGTACGTAGAGAA	CTGCTTACCCGCTACGT					
BoAstV-254-BRA	GAAATAAATAAGAGCACCGGAGAGGT	ACAGACATGTGCATGATTGGTACGTGGAGAACTTCTGCTTACCCGCTACGT						
HAstV-1 Beijing/176	TTTCATCAATAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ACAGACATGTCCATGAATGGTATGTTGATAAACCCTCCTTAATCGCCATGT						
HAstV-4 Guangzhou/CHN	TTTCATCAATAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ACAGACATGTGCATGAAATGGTATGTTGATAAACCCTCCTTAATCGCCATGT						
HAstV-4 Dresden	TTTCATCAATAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ACAAACATGTTCCATGAAATGGTATGTTGACAAACCCTCCTTAATCGCCATGT						
HAstV-1 HUN4520	TTTCATCAATAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ACAGACATGTACATGAATGGTATGTTGACAAACCCTCCTTAATCGCCATGT						
HAstV-1 Beijing/128	TTTCATCAATAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ACAGGCACGTGCATGAATGGTATGTTGATAAACCCTCCTTAATCGTCATGT						
HAstV-4 Goiania/12/95	TTTCATCAATAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ACAGACATGTACATGAATGGTATGTTGATAAACCCTCCTTAATCGCCATGT						
HAstV-5 Goiania/12/94	TTTCATCAATAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ATAGACATGTACATGAATGGTATGTTGATAAACCCTCCTCAACCGTCATGT						
HAstV-3 Nsc08-3364	TTTATAAACAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ATAGACATGTGCATGAAATGGTATGTTGACAACTTCTCTCAATCGCCATGT						
HAstV-6 Nsc09-B4	TTTCATCAATAAAGACCAACGTGAGAAAGT	ACAGACATGTTTCATGAGTGGTATGTTGACAAACCCTCCTTAACCCGCTATGT						
Chicken AstV 4175	TTTCATGACGCCCCGGTATAAACCACCGCGCTAACAAAGGAAATGTTTATTGGTACACTAAAACTCTGTTGGAGAAAAATAAT							
Minke whale AstV-2	TTTATCAATAAGGAGCAGCGTGATAAAT	ATCAGAGCATGTACCAGTGGTACGTCTACCATCTTATTAACCCGCTGGT						
PoAstV17-4/CAN/2006	AAGATGAACAAAGCACACAGAGAAAGAT	ACAGACACGTACACGAAATGGTACGTTGAAAACTCTCTGACAAAGGTACGT						
PAstV-2/2007/HUN	AAGATGAATAAAGTGCAATAGAGAGAGAT	ACAGACACGTACACGATTTGGTACGTTGAAAAACCCTCCTAACTAGGTACGT						
PoAstV11-2/CAN/2006	AAAATGAACAAAGAACACAGAGAAAGGT	ACAAACATATCCACGACTGGTACGTGGAGAACTCTCTGACCCGCTATGT						
PoAstV15-2/CAN/2006	AAAATGAACAAAGCACATAGAGATAGAT	ACAAACATGTCCACGACTGGTACGTGGAGAACTCTCTAAACCCGCTATGT						
PoAstV18-5/CAN/2006	AAAATGAACAAAGAACATAGAGAAAGAT	ACAAACATGTCCACGACTGGTACGTGGAGAACTCTCTAAACCCGCTATGT						
PoAstV10-4/CAN/2006	AAGATGAATAAAGCACACAGAGAAAGAT	ACAAACACATCCACGATTTGGTACGTGGAGAACTCTCTGACCCGCTATGT						
PoAstV19-3/CAN/2006	AAGATGAATAAGATACACAGAGAAAGAT	ACAAACACATCCACGATTTGGTACGTGGAGAACTCTCTGACCCGCTATGT						
PoAstV13-1/CAN/2006	AAAATGAACAAAGTACACAGAGAAAGAT	ACAAACACATCCACGATTTGGTACGTGGAGAACTCTCTGACCCGCTATGT						
PoAstV20-5/CAN/2006	AAAATGAACAAAGAACACAGAGAAAGAT	ACAAACATGTCCACGATTTGGTACGTGGAGAACTCTCTAAACCCGCTATGT						
PoAstV15-6/CAN/2006	AAGATGAATAAACAACACAGAGAGAGGT	ACAAACATGTCCACGACTGGTACGTGGAAAACTCTCTGACCCGCTACGT						
BoAstV-B34	AAGATCAACAACACAGCATCGTGAGAGGT	ACAGGCACGTACATGACTGGTACGTCCACAACCTTCTCACCAGATATGT						
CcAstV-1	AAAATCAATAAACAACACCCGAGAGAGGT	ACAGGCACGTACATGAAATGGTATGTCCACAACCTTCTAACTAGATACGT						
BoAstV-B18	AAAATCAACAACAACACCCGTGAGAGGT	ATAAGCATGTACACGATTTGGTACGTCCACAACCTTCTCACCAGGTATGT						
BoAstV-B76-2	AAGATCAACAACAACACAGAGAGAGGT	ACAAACACGTGACGACTGGTACGTCCACAACCTTCTCACCAGATATGT						
BoAstV-B161-2	AAGATTAACAACAACACAGAGAGAGGT	ACAAACACGTGACGACTGGTACGTCCACAACCTTCTCACCAGATATGT						
CcAstV-2	AAGATTAACAACAACACCCGACAGGT	ATAAGCATGTGACGATTTGGTACGTCCACAACCTTCTCACCAGATATGT						
BoAstV-B76-1	AAGATCAACGCTGAACATAGGAAGCGCT	ACCAGCACGTACATGACTGGTATGTGCAGAACTTACTCCACCCGCTACGT						
BoAstV-B170	AAGATCAACGCTGAACATAGGAAGCGCT	ACCAGCACGTACATGATTGGTACGTGCAGAACTTACTCCACCCGCTACGT						
BoAstV-B161-1	AAGATCAACGCTGAACACAGGGAGCGCT	ACCAGCACGTCCACGATTTGGTATGTGCAGAACTTACTCCACCCGCTATGT						
Bat AstV-Tm/DX14	TTTATAGATGAATCACAGAGAACCCAGTCAATGATGAGATCATGAGTGGTATGTGAAATAACCTTGTTCATAGGTATGT							
Bat AstV-Tm/LD38	TTGTTGGATAAATCTTACCCGACTGAAACCAATCGTATGGTATATGATTGGTATGTTCCCAATTTGTTATCGTTATGT							
Bat AstV-Tm/LD154	TTGTTGGATAGGCTTATCGTACTGAAAGTAAATCGTTTCAGTTTATGATTGGTATGTTCTCAACTTTGTTATCGTTATGT							
Bat AstV-Tm/LD16	ATGCTTGATAAATCTTATCGAAGTCTTAAATAAATCAGTTTACGATTTGGTATGTTCTCAACTTTGTTATCGTTATGT							
Bat AstV-1 AFCD329	ATGTTACATCCTGTTTATAAACAATCTTAAACAAGGAGTGTATATGATTGGTATGTTCTCCCACTTTTACGTTATGT							
Bat AstV-Ms/HK61	TTCTTAGACCCAGTTTATCGTACGCAACTCAACAAGTCTATCTATGAGTGGTATGTAGACCAGCTTCTCCATAGGTATGT							
Bat AstV-Sk/HK63	CTTTTAGACCCGTTATATAAGACTGATTTGAAACAAGTCTATTTATGAAATGGTATGTTGATCAATTTTACATCGCTATGT							
Bat AstV-Ms/sy18	CTTTTGGACCCGTTCTATAAGACTCAACTTAAATCGCTCTATATATGGTATGTTGACCAACTTTTACATCGTTATGT							

Figura 8 - Alinhamento das seqüências nucleotídicas de fragmento de 80bp do gene *pol* de astrovírus bovino (BoAstV) entre as 11 amostras detectadas por RT-PCR, a partir de amostras fecais, e posteriormente sequenciadas; e outras seqüências de AstV conhecidos, recuperadas do GenBank, conforme a tabela 2.

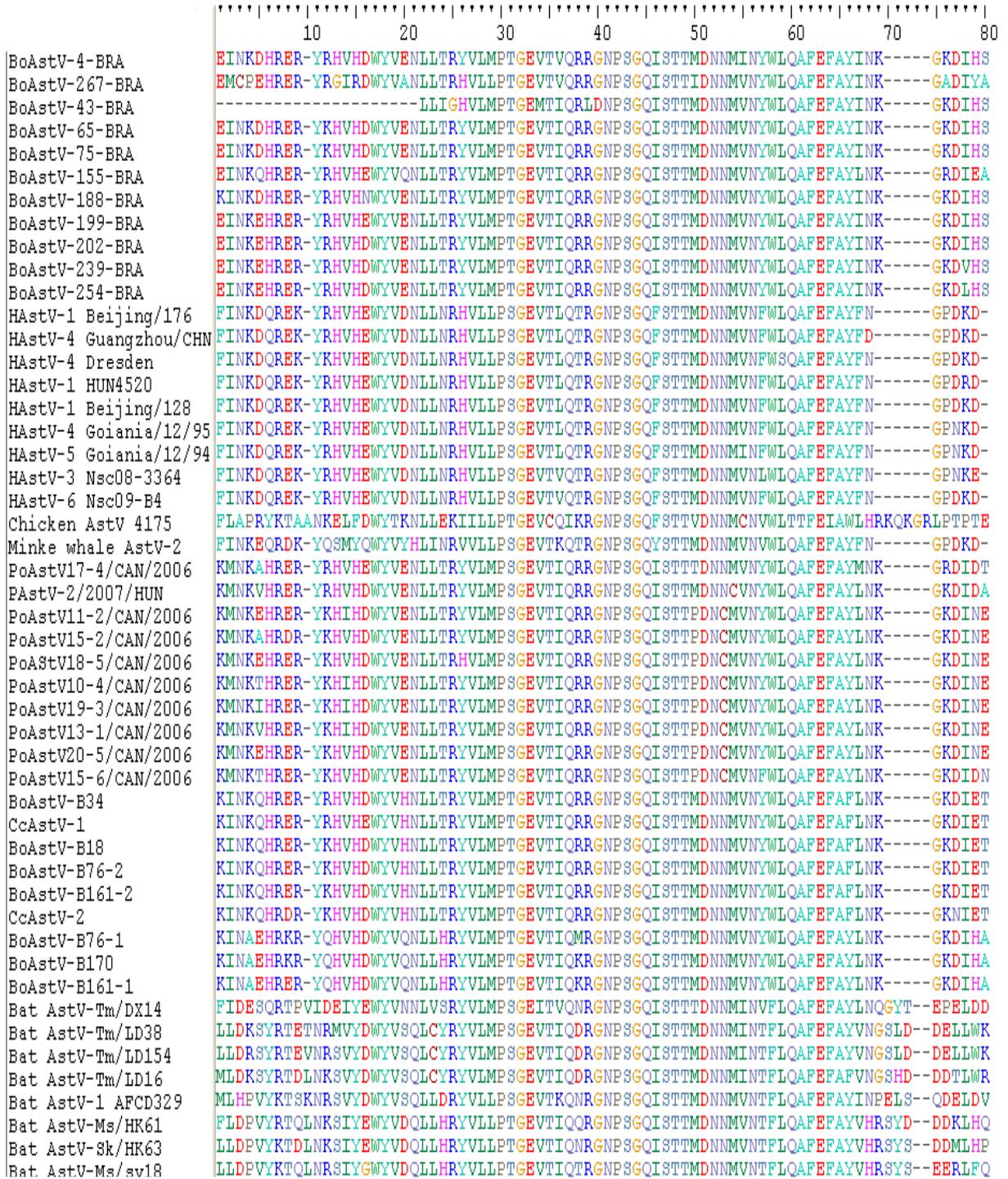


Figura 9 - Sequências de aminoácidos alinhadas a partir de fragmentos do gene *pol* de (BoAstV), são apresentadas as amostras sequenciadas no presente trabalho (quadro 2) e traduzidas em aminoácidos, juntamente com outras sequências de astrovírus representados na tabela 2.

Vírus	Similaridade/Identidade (%)														
	BoAstV-4-BRA	BoAstV-267-BRA	BoAstV-65-BRA	BoAstV-155-BRA	BoAstV-254-BRA	HAstV-1 128	CAstV 4175	Minke MH03	PAstV-2 HUN	PoAstV15-2	CcAstV-1 DNK	BoAstV-B18	BoAstV-B161-2	BoAstV-B161-1	Bat
BoAstV-4-BRA	—	66.5	87.9	74.9	85.4	69.0	48.0	65.3	68.5	70.1	72.0	72.5	71.4	73.0	56.1
BoAstV-267-BRA	61.5	—	67.8	68.9	68.8	64.8	50.0	65.4	66.1	63.2	66.9	68.6	68.8	72.3	60.4
BoAstV-65-BRA	81.1	62.8	—	75.2	87.9	68.6	51.2	65.9	69.5	71.4	74.1	73.0	73.6	74.4	57.8
BoAstV-155-BRA	68.2	63.9	68.5	—	77.6	66.6	50.3	64.4	75.2	74.9	80.1	81.1	81.7	79.2	62.0
BoAstV-254-BRA	79.0	64.2	81.4	71.2	—	68.5	51.1	66.4	71.4	72.5	75.2	74.7	74.7	74.4	58.0
HAstV-1 128	63.1	59.8	63.1	60.6	62.5	—	52.5	72.9	67.5	64.7	68.5	66.8	66.8	68.5	61.0
CAstV 4175	48.8	51.8	51.8	50.4	51.8	53.6	—	50.0	49.2	43.9	49.5	48.0	50.0	49.6	47.3
Minke MH03	59.8	60.6	60.4	58.8	61.2	66.3	51.5	—	62.6	62.0	63.0	67.4	66.0	67.1	60.9
PAstV-2 HUN	62.5	61.7	63.6	69.3	65.5	61.7	50.4	57.1	—	74.0	74.9	75.7	76.0	73.6	58.2
PoAstV15-2	63.6	58.0	65.0	68.5	66.3	58.8	43.7	56.3	68.5	—	72.8	73.9	74.9	74.9	62.0
CcAstV-1 DNK	66.0	62.0	68.2	74.1	69.3	62.8	50.1	58.0	69.0	66.8	—	87.9	87.1	77.4	59.3
BoAstV-B18	66.6	63.9	67.1	75.2	68.7	60.9	49.1	61.7	69.8	67.9	81.9	—	93.3	78.2	59.9
BoAstV-B161-2	65.5	64.4	67.7	75.7	68.7	60.9	50.4	60.4	70.1	69.0	81.1	87.3	—	79.5	59.0
BoAstV-B161-1	67.1	68.2	68.5	73.3	68.5	62.8	49.6	61.5	67.7	69.0	71.4	72.2	73.6	—	61.0
Bat	52.8	57.4	55.0	59.3	55.0	59.3	47.4	58.2	55.5	56.3	56.6	57.4	56.3	58.8	—

Quadro 3 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências nucleotídicas para fragmento de 432bp do gene *pol* de astrovírus bovino, entre 5 amostras detectadas por RT-PCR, e posteriormente sequenciadas, e sequências de outros astrovírus (humano, morcego, bovino, suíno, aviário, cervídeo e cetáceo) recuperadas do GenBank.

Vírus	Similaridade/Identidade (%)														
	BoAstV-4-BRA	BoAstV-267-BRA	BoAstV-65-BRA	BoAstV-155-BRA	BoAstV-254-BRA	HAstV-1 128	CAstV 4175	Minke MH03	PAstV-2 HUN	PoAstV15-2	CcAstV-1 DNK	BoAstV-B18	BoAstV-B161-2	BoAstV-B161-1	Bat
BoAstV-4-BRA	—	69.3	93.0	83.3	92.1	69.0	43.5	62.6	76.7	78.3	83.6	83.6	82.8	81.0	53.4
BoAstV-267-BRA	87.7	—	71.1	71.9	72.8	64.7	41.3	60.9	69.8	64.3	69.8	68.1	69.0	70.7	55.1
BoAstV-65-BRA	96.5	89.5	—	86.0	93.9	70.7	46.0	63.5	77.6	80.0	87.1	87.1	87.9	82.8	53.4
BoAstV-155-BRA	93.9	86.8	94.7	—	85.1	69.8	43.5	65.2	81.0	77.4	88.8	87.9	87.1	85.3	55.1
BoAstV-254-BRA	98.2	89.5	97.4	95.6	—	71.6	44.4	65.2	78.4	77.4	87.1	85.3	86.2	83.6	55.1
HAstV-1 128	86.8	78.1	86.0	87.7	87.7	—	42.6	76.3	68.1	62.1	71.6	69.0	69.8	69.0	55.8
CAstV 4175	59.5	56.2	58.7	57.9	59.5	57.9	—	39.7	40.2	40.2	45.1	46.7	46.7	43.7	36.9
Minke MH03	80.7	77.0	81.6	85.1	81.6	89.5	59.5	—	64.7	61.2	64.7	65.5	64.7	67.2	59.7
PAstV-2 HUN	87.1	80.2	87.1	88.8	87.9	83.6	54.5	77.6	—	78.4	80.2	81.0	80.2	81.0	53.8
PoAstV 15-2	89.5	82.1	89.5	88.6	89.5	82.5	53.7	77.0	85.3	—	78.4	81.0	80.2	81.9	53.9
CcAstV-1 DNK	91.4	86.2	93.1	94.0	93.1	85.3	56.2	83.6	87.9	86.2	—	96.6	97.4	85.3	54.6
BoAstV-B18	91.4	86.2	93.1	94.8	93.1	85.3	56.2	82.8	87.9	86.2	99.1	—	99.1	86.2	52.9
BoAstV-B161-2	91.4	86.2	93.1	94.8	93.1	85.3	56.2	82.8	87.9	86.2	99.1	99.1	—	85.3	53.8
BoAstV-B161-1	92.2	86.2	93.1	93.1	93.1	86.2	61.2	81.0	87.9	87.9	93.1	93.1	93.1	—	52.9
Bat	78.1	76.3	78.9	79.8	78.1	78.1	53.7	78.9	71.6	75.4	75.0	75.0	75.0	72.4	—

Quadro 4 - Comparação das porcentagens de similaridade (abaixo da diagonal) e identidade (acima da diagonal) das sequências de aminoácidos para (BoAstV). As amostras BoAstV-BRA 4, 65 e 254 são mais próximas, apresentando valores de similaridade/identidade maiores quando comparadas com a amostra 155 que apresenta valores altamente relacionados com a amostra de cervídeo (CcAstV-1), enquanto a amostra 267 apresenta um valor de dispersão mais homogêneo entre as amostras.

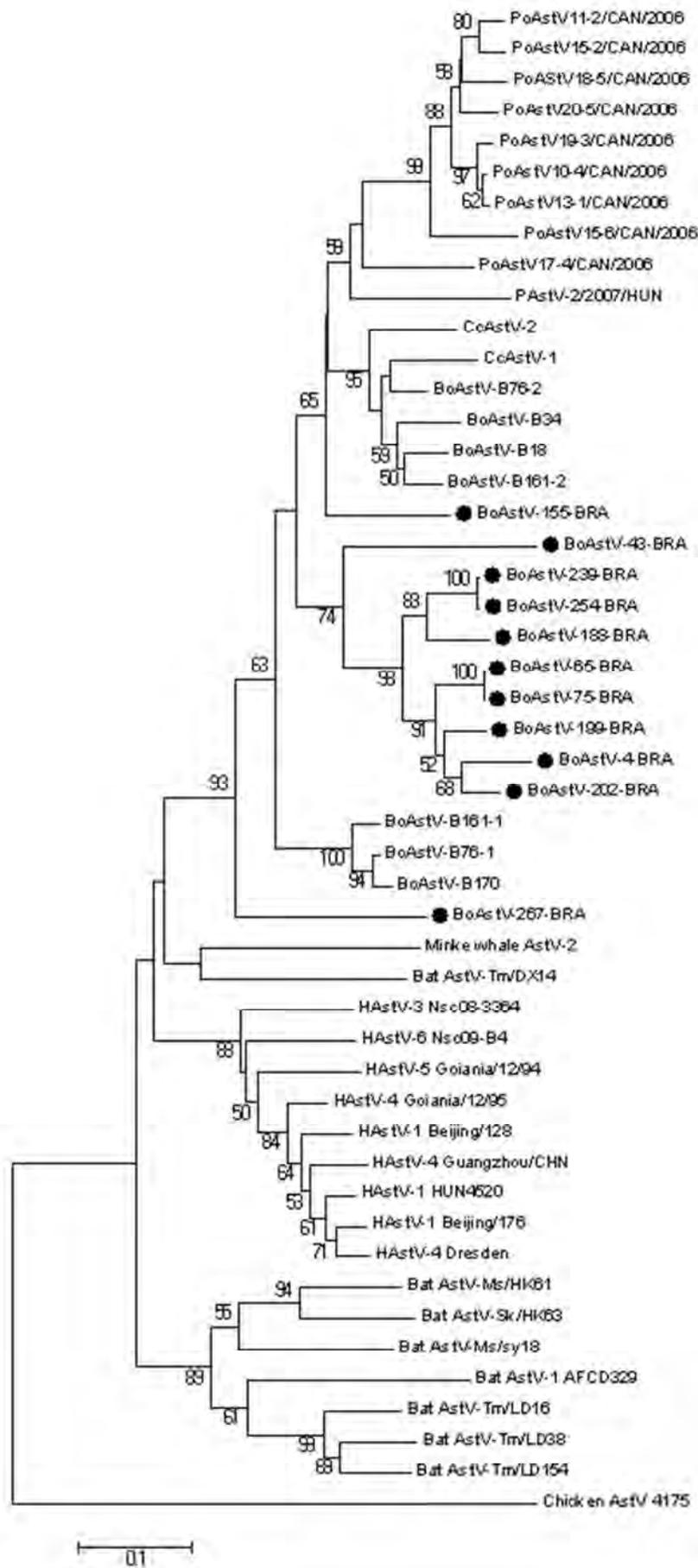


Figura 10 - Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências nucleotídicas referente à amplificação de um fragmento de 432pb do gene *pol* de astrovirus bovino, referente à região 3258-3612 quando comparada com o genoma completo da amostra BoAstV-B76/HK (HQ916316). As sequências BoAstV-BRA obtidas no presente estudo estão em destaque. A barra de escala estima a distância filogenética das sequências nucleotídicas.

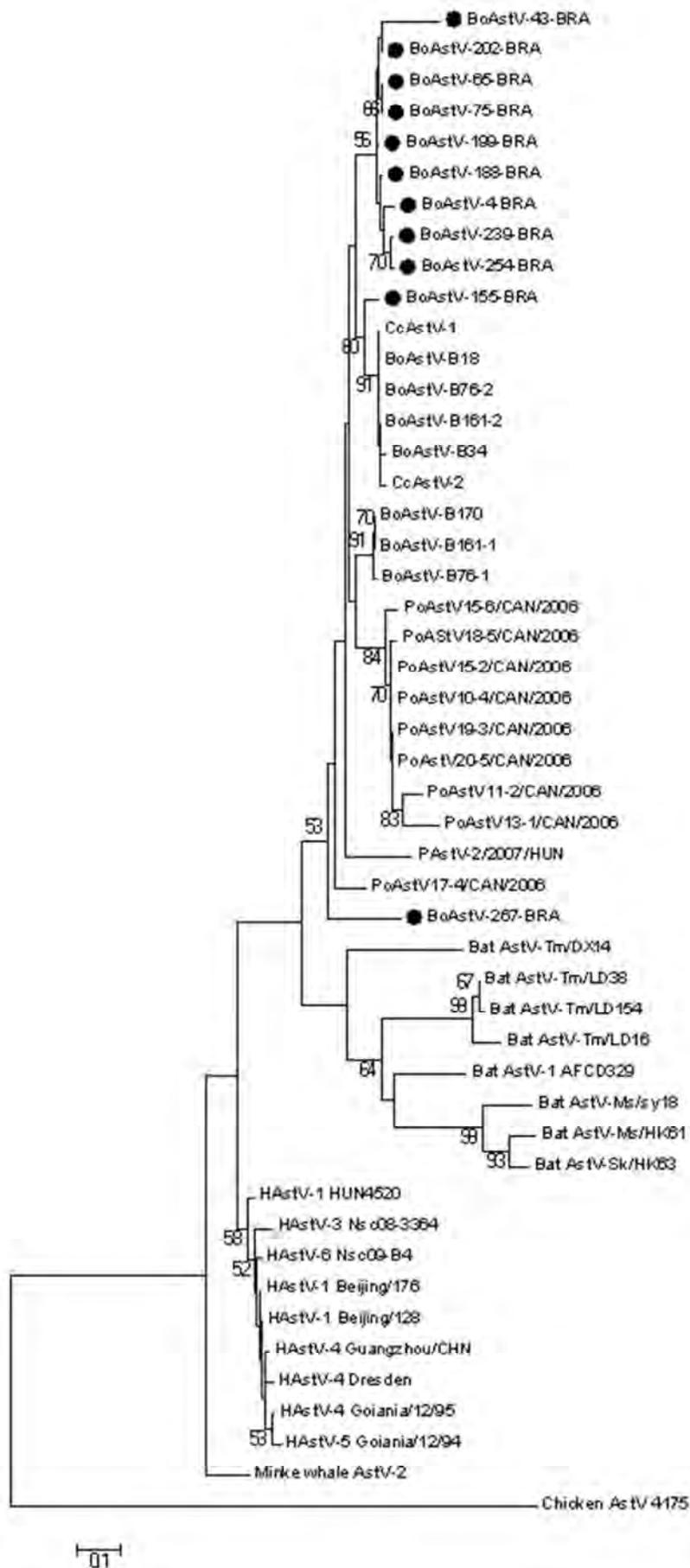


Figura 11 - Cladograma representando reconstrução filogenética baseada no alinhamento de sequências de aminoácidos traduzidas, referente à amplificação de um fragmento de 432nt do gene *pol* de astrovirus bovino. Valores de bootstrap > 50% para 1000 pseudo-réplicas estão indicados juntos aos nós. As seqüências BoAstV BRA obtidas no presente estudo estão em destaque.

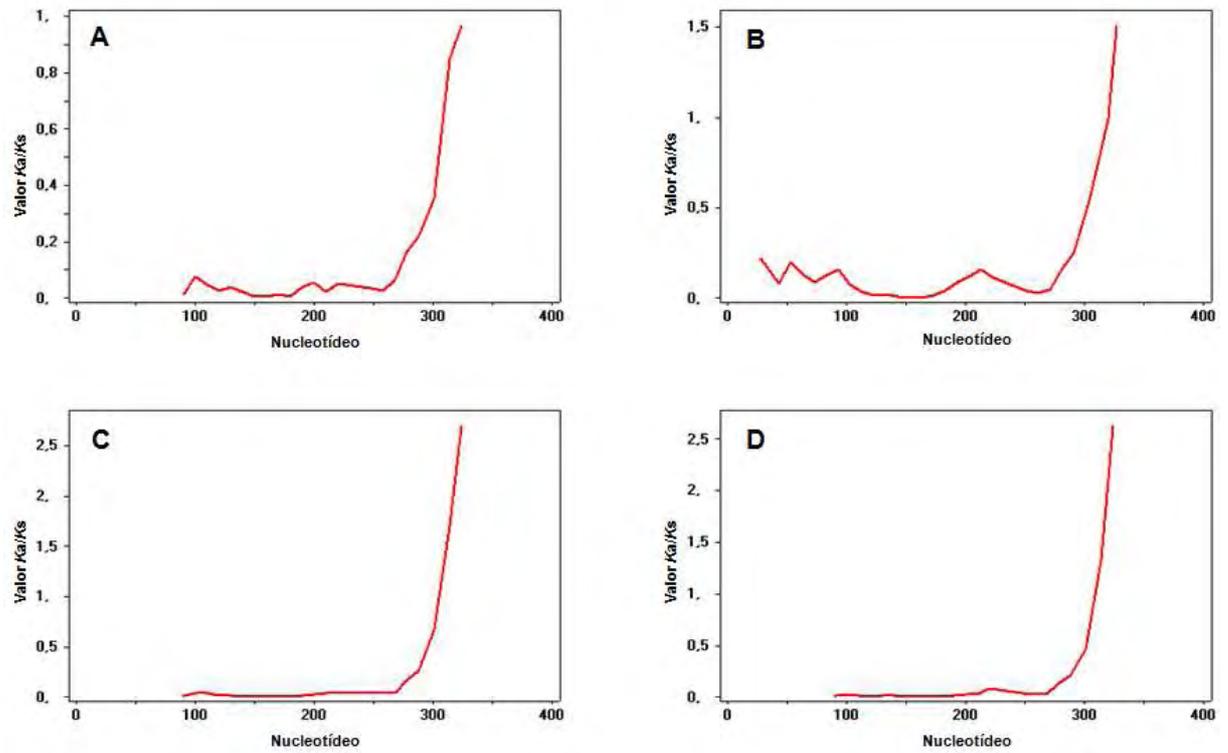


Figura 12 - Gráficos comparativos *sliding window* de razões  $Ka/Ks$ . (A) Sequências BoAstV BRA exceto 267 versus BoAstV-267-BRA. (B) Sequências de BoAstV utilizadas na reconstrução filogenética versus BoAstV-267-BRA. (C) Sequências BoAstV BRA exceto 155 versus BoAstV-155-BRA. (D) Sequências de BoAstV utilizadas na reconstrução filogenética versus BoAstV-155-BRA.

## 5 DISCUSSÃO

A presente investigação, na perspectiva de bioprospecção de novos agentes virais em circulação no Brasil, objetivou a detecção e caracterização de Astrovirus Bovino (BoAstV) dado seu envolvimento na etiologia de gastroenterites em bovinos desde o ano de 1978, sendo a diarreia uma das mais importantes enfermidades que afetam bovinos em especial neonatos, gerando grandes perdas econômicas para a atividade pecuária, aliado ao fato da ausência de dados a respeito da presença deste agente viral no rebanho brasileiro e importância da bovinocultura nacional.

Uma vez que na literatura pertinente, os poucos trabalhos publicados apresentem uma relação entre BoAstV e ocorrência de enterites, em especial entre neonatos, não se descartando, contudo, a presença do vírus em animais adultos, optou-se por incluir amostras fecais de animais de diferentes idades. A presente investigação permitiu a formação de um banco de 272 amostras fecais bovinas, a partir de rebanhos de diferentes propriedades localizadas em municípios da região centro-sul do país, permitindo-se, previamente à realização do trabalho de prospecção, subsidiar a eventual detecção de variantes de BoAstV em circulação no país associadas a fatores de variabilidade geográfica, para os quais vírus de RNA são susceptíveis, contribuindo preponderantemente para a ecologia desses microorganismos (DUKE-SYLVESTER et al., 2013).

Para detecção de RNA viral de BoAstV, optou-se por utilizar o procedimento de RT-PCR buscando-se amplificação de fragmento do gene *pol*, segundo TSE et al. (2011). Das 272 amostras analisadas, 39 apresentaram positividade através da técnica de RT-PCR, confirmando, de maneira inédita, a circulação de astrovírus bovino em cinco diferentes estados do Brasil.

Ainda que a RT-PCR aplicada ao gene *pol* apresente níveis de sensibilidade e especificidade adequados (TSE et al., 2011), 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 *pol*, das 39 amostras, 11 (28%) puderam ser sequenciadas, devido à impossibilidade de realizar o sequenciamento de amostras apresentando valores inferiores a 20ng/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.

A positividade de amostras provenientes de animais diarreicos, inferindo-se uma possível associação entre a patogenia das infecções por BoAstV e quadro clínico de diarreia, corrobora os dados obtidos por OEM & AN (2014). Semelhantemente, o predomínio de bezerros entre o total de positivos detectados no presente estudo (38/39, 97,4%) corrobora com os resultados de OEM & AN (2014), onde a predominância maior de positivos situou-se na faixa de bovinos  $\leq 6$  meses de vida. Em tempo, porcentagens de positividade menores entre animais adultos, 2,4% (5/209) foi previamente verificada por TSE et al. (2011), entre animais assintomáticos. Na presente investigação, um animal positivo, assintomático, correspondendo a 2,6% do total de positivos, apresentava 8,5 meses de idade. Interessantemente, não apenas entre animais com aptidão para leite, mas também para corte (15,4% do total) foram detectados positivos. Não obstante, não foi encontrada relação de significância estatística entre os sistemas de produção envolvidos na amostragem e positividade para BoAstV, bem como entre animais machos e fêmeas versus positividade para BoAstV.

No tocante à análise de composição das sequências nucleotídicas e as respectivas sequências deduzidas de aminoácidos, a similaridade de aminoácidos para as amostras sequenciadas foi acima de 86,8% quando comparadas umas com as outras; já quando comparadas com amostras BoAstV de referência a similaridade apresentada foi superior a 86,2% e identidade variando entre 68,1 a 87,9%. Depreende-se certa homogeneidade em níveis elevados em termos de similaridade, contrapondo percentuais menores encontrados entre variantes de BoAstV detectados por OEM & AN (2014) que propuseram classificação de BoAstV em diferentes genótipos, ainda não consensual, dada a recente proposição.

Realizou-se a construção de árvores filogenética a partir das onze sequências nucleotídicas geradas neste estudo e de outras 38 sequências de astrovírus de espécies divergentes, de vários países. Da mesma forma, conduziu-se reconstrução filogenética baseada nas sequências deduzidas de aminoácidos a partir das sequências nucleotídicas correspondentes. Ambas as reconstruções apresentaram perfis semelhantes de agrupamento, indicando robustez e fidedignidade na edição, alinhamento e escolha das matrizes de substituição realizados.

Nos cladogramas obtidos, a maioria das sequências BRA se agrupou conjuntamente em clado próximo a outros BoAstV, excetuando-se as sequências BRA-155 e BRA-267. Na tentativa de se verificar eventuais eventos evolutivos que justificariam o

posicionamento divergente de ambas as amostras, foram realizadas análises para detecção de seleção positiva e recombinação atuando sobre essas sequências, forças evolutivas frequentemente encontradas entre vírus de RNA (SIMON-LORIERE & HOLMES, 2011). Para ambas as amostras, não se verificou atuação desses eventos, sugerindo a presença de possíveis variantes ou genótipos de BoAstV circulantes no país, numa configuração filogenética similar a proposta por OEM & AN (2014) em investigação com amostras de BoAstV detectadas na Coréia do Sul. Nesse contexto, contudo, para ambas as variantes (BRA-155 e BRA-267), é plausível se supor que estudos posteriores permitam a identificação de episódios de recombinação, dada o conhecimento incipiente sobre a circulação de outros BoAstV no país, ou ainda de variantes típicas de animais silvestres, dada a diversidade de fauna e nichos ecológicos encontrados no país, principalmente em termos do contato ou proximidade entre espécies animais de produção e espécies silvestres. Asserções semelhantes sobre a diversidade de astrovírus também foram estabelecidas por PHAN et al. (2014) ao investigarem a diversidade de astrovírus humanos em Burkina Faso (África), sem indicação de fenômenos de recombinação, inferindo-se que, apesar da origem monofilética das variantes humanas, a diversidade de estirpes é grande. Muito embora, estudos têm indicado a ocorrência desse evento em linhagens de astrovírus humano (HAstV tipo 2), onde 2 novos genótipos foram identificados, a partir de combinação de material genético nas regiões ORF1b e ORF2 com HAstV tipo 3 e 1, respectivamente, originando as estirpes HAstV 2c e 2d (DE GRAZIA et al., 2012).

Por outro lado, indicações de eventos de troca de hospedeiro (*host-switch*), comumente encontrado entre vírus de RNA, também pode contribuir para elucidar eventuais agrupamentos inesperados de variantes nas reconstruções filogenéticas tendo-se como modelo o BoAstV. Exemplo recente foi sugerido no agrupamento monofilético entre BoAstV-NeuroS1, associado a sintomas neurológicos em bovinos, e OAstV, com altas porcentagens de bootstrap associadas em reconstruções baseadas em três genes diferentes (protease, *pol* e capsídeo) (LI et al., 2013).

No presente trabalho, a possível ocorrência de variantes também pode não estar dependente diretamente do distanciamento geográfico entre elas. Nesse sentido, embora as amostras BRA-65, BRA-75 e BRA-155 sejam originárias do mesmo município (Jaboticabal) do estado de São Paulo, a partir de animais menores de 4 meses de vida, as amostras BRA-65 e BRA-75 agruparam-se monofileticamente com valor máximo de bootstrap (100%), na reconstrução baseada em nucleotídeos, diferentemente da amostra BRA-155. Interessantemente, as amostras BRA-65 e BRA-75 provêm de um mesmo rebanho localizado

em área semi-urbana, enquanto a amostra BRA-155 é oriunda de rebanho, submetido a condições semi-intensivas de produção, em propriedade da zona rural do município distante aproximadamente 10 Km do primeiro, com grande proximidade a áreas de matas onde a presença de animais silvestres é constante. Novamente, torna-se instigante, portanto, a prospecção de astrovírus em espécies silvestres nas circunvizinhanças da propriedade, na tentativa de melhor caracterização dessa variante.

Interessantemente, apesar da ausência de pressão positiva atuando sobre as sequências BRA-155 e BRA-267, como um todo, análise de polimorfismo indicou que as razões de substituição de nucleotídeos ( $Ka/Ks$ ) são variáveis ao longo das sequências, alcançando valores característicos de seleção positiva ( $\omega > 1$ ) nos respectivos segmentos finais das extremidades 3' de ambas, particularmente quando confrontadas com as demais variantes de BoAstV, detectadas em outros países (figura 12). Corroborando a disposição nos cladogramas obtidos, a sequência BRA-155, filogeneticamente mais próxima das demais BRA, porém agrupada em clado parafilético com outros BoAstV e astrovírus de cervídeos, apresentou  $\omega < 1$  quando analisada contra as demais sequências BRA, indicando atuação de seleção negativa ou purificadora; diferentemente da sequência BRA-267, em posição mais basal dos clados envolvendo estípes bovinas, suínas e de cervídeos, que apresentou já no contraste com as demais sequências BRA, valores de  $\omega > 1$ , também na porção 3', ressaltando seu posicionamento nos cladogramas. Forças de seleção negativa também podem justificar o posicionamento da sequência BRA-43, proveniente de bovino de 35 dias de vida e com aptidão para corte, submetido a regime extensivo de produção (município de Claraval-MG), apresentando menor porcentagem de similaridade para com as amostras BRA-4, BRA-65, BRA-75, BRA-188, BRA-199, BRA-202 e BRA-239, quando comparadas umas com as outras, tanto em relação às respectivas sequências de nucleotídeos como aquelas deduzidas de aminoácidos. Embora BRA-43 tenha constituído ramo em separado das demais na reconstrução baseada em nucleotídeos, agrupou-se conjuntamente na reconstrução baseada em aminoácidos, contudo, de maneira mais distante

Nesse contexto, não se pode desconsiderar que estudos posteriores envolvendo sequenciamento de fragmentos maiores e/ou do genoma completo dessas amostras possam ser mais elucidativos na fundamentação da real ação de forças evolutivas na diversificação das variantes de BoAstV detectadas no presente trabalho.

Em síntese, os dados obtidos no presente estudo contribuem, de forma inédita, para a compreensão da presença e dispersão BoAstV, como agente viral emergente, em

rebanhos da região centro-sul do país, trazendo subsídios para o incipiente conhecimento da epidemiologia desse vírus no Brasil.

## 6 CONCLUSÕES

1. Constitui-se um banco de 272 amostras fecais bovinas, provenientes de animais diarreicos e sadios, de diferentes idades, a partir de rebanhos leiteiros e de corte, de diferentes regiões, em especial centro-sul do Brasil.

2. Através da técnica de RT-PCR aplicada à amplificação de fragmento de 432pb do gene *pol* de BoAstV, foram detectadas 39 amostras positivas oriundas predominantemente de animais menores de 6 meses de idade e com manifestações clínicas de diarreia.

3. A partir de 11 amostras positivas ao RT-PCR, foram obtidas sequências nucleotídicas, denominadas de acordo o número da amostra e sigla BRA, com elevadas porcentagens de similaridade em relação às sequências correspondentes de outros BoAstV depositadas em banco de dados.

4. Nas reconstruções filogenéticas baseadas tanto nas sequências nucleotídicas quanto nas sequências deduzidas de aminoácidos, as sequências BRA se agruparam conjuntamente, com exceção das sequências e BRA-267, sendo que a sequência BRA-155 formou clado com outros BoAstV e CcAstV e a sequência BRA -267 constituiu clado basal a clados de BoAstV, PoAstV e CcAstV.

5. O posicionamento filogenético das sequências BRA-155 e BRA-267 não derivou da ação de forças evolutivas, seja de episódios de seleção positiva, seja de eventos de recombinação; contudo, as razões  $Ka/Ks$  ao longo de ambas as sequências alcançaram valores maiores do 1, indicativo de seleção positiva, particularmente na porção 3' das mesmas, sugerindo que a diversidade de variantes de BoAstV detectada seja decorrente da circulação de diferentes genótipos no país.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASCAL, F.; ZARDOYA, R.; POSADA, D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v.21, p.2104–2105, 2005.

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 Res.**, v.25, p.3389–3402, 1997.

APPLETON, H.; HIGGINS, P. G. Viruses and gastroenteritis in infants. **Lancet**, v.1, p.1297, 1975.

AROONPRASERT, D.; FAGERLAND, J. A.; KELSO, N. E.; ZHENG, S.; WOODE, G. N. Cultivation and Partial Characterization of Bovine Astrovirus. **Vet. Microbiol.**, v.19, p.113–125, 1989.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J. F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.**, v.18, p.7-34, 2002.

BASS, D. M.; QIU, S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. **J. Virol.**, v.74, p.1810–1814, 2000.

BAXENDALE, W.; MEBATSION, T. The isolation and characterisation of astroviruses from chickens. **Avian Pathol.**, v.33, p.364–370, 2004.

BLOMSTRÖM, A. L.; WIDÉN, F.; HAMMER, A. S.; BELÁK, S.; BERG, M. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. **J. Clin. Microbiol.**, v.48, p.4392–4396, 2010.

BON, F.; FASCIA, P.; DAUVERGNE, M.; TENENBAUM, D.; PLANSON, H.; PETION, A. M.; POTHIER, P.; KOHLI, E. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.3055–3058, 1999.

BRIDGER, J. C. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. **Vet. Rec.**, v.107, p.532–533, 1980.

BRIDGER, J. C.; HALL, G. A.; BROWN, J. F. Characterization of a Calici-Like Virus (Newbury Agent) Found in Association with Astrovirus in Bovine Diarrhea. **Infect. Immun.**, v.43, p.133-138, 1984.

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.

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

CHU, D. K. W.; POON, L. L. M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. M. Novel astroviruses in insectivorous bats. **J. Virol.**, v.82, p.9107–9114, 2008.

DAOLIANG, L.; WENHUI, J.; TONGLING, S.; LI, C.; ZHIBIAO, Y.; CONGLI, Y.; XIUGUO, H. Molecular characterization of a porcine astrovirus strain in China. **Arch. Virol.**, v.156, p.1869–1875, 2011.

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

DE GRAZIA, S.; MEDICI, M. C.; PINTO, P.; MOSCHIDOU, P.; TUMMOLO, F.; CALDERARO, A.; BONURA, F.; BANYAI, K.; GIAMMANCO, G. M.; MARTELLA, V. Genetic heterogeneity and recombination in human type 2 astroviruses. **J. Clin. Microbiol.**, v.50, p.3760-3764, 2012.

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.

DENNEHY, P. H.; NELSON, S. M.; SPANGENBERGER, S.; NOEL, J. S.; MONROE, S. S.; GLASS, R. I. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. **J. Infect. Dis.**, v.184, p.10–15, 2001.

DEY, S. K.; PHAN, G. T.; NISHIMURA S.; MIZUGUCHI M.; OKITSU S., USHIJIMA H. Molecular and epidemiological trend of sapovirus, and astrovirus infection in Japan. **J. Trop. Pediatr.**, v.56, p.205–207, 2010.

DREXLER, J. F.; CORMAN, V. M.; WEGNER, T.; TATENO, A. F.; ZERBINATI, R. M.; GLOZA-RAUSCH, F.; SEEBENS, A.; MULLER, M. A.; DROSTEN, C. Amplification of emerging viruses in a bat colony. **Emerging Infect. Dis.**, v.17, p.449–456, 2011.

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. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.**, v.368, p.2-11, 2013.

ESTES, M. K. Rotaviruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.2950, 1996.

FAO. **World Livestock 2013** – Changing disease landscapes. Rome, p.2-99, 2013.

FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. **Virus Taxonomy**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.859–864. Apresentado no Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses, 8.

FINKBEINER, S. R. Detection of newly described astrovirus MLB1 in stool samples from children. **Emerging Infect. Dis.**, v.15, p.441–444, 2009.

FINKBEINER, S. R.; ALLRED, A. F.; TARR, P. I.; KLEIN, E. J.; KIRKWOOD, C. D.; WANG, D. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. **PloS Pathog.**, v.4, e1000011, 2008a.

FINKBEINER, S. R.; HOLTZ, L. R.; JIANG, Y.; RAJENDRAN, P.; FRANZ, C. J.; ZHAO, G.; KANG, G.; WANG, D. Human stool contains a previously unrecognized diversity of novel astroviruses. **Viol. J.**, v.6, p.161, 2009a.

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

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

FLEET, G. H.; HEISKANEN, P.; REID, I.; BUCKLE, K. A. Foodborne viral illness-status in Australia. **Int. J. Food Microbiol.**, v.59, p.127–136, 2000.

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

GOUGH R. E. Laboratory confirmed outbreaks of duck virus enteritis (duck plague) in the United Kingdom from 1977 to 1982. **Vet. Rec.**, v.114, p.262–265, 1984.

GUIX, S.; BOSCH, A.; RIBES, E.; DORA MARTÍNEZ, L.; PINTÓ, R. M. Apoptosis in astrovirus-infected CaCo-2 cells. **Virology**, v.319, p.249–261; 2004.

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

HOET, A. E.; CHO, K. O.; CHANG, K. O.; LOERCH, S. C.; WITTUM, T. E.; SAIF, L. J. Enteric and nasal shedding of bovine torovirus (Breda virus) in feedlot cattle. **Am. J. Vet. Res.**, v.63, p.342–348, 2002.

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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.15, p.205–212, 2003.

HOSHINO, Y.; ZIMMER, J. F.; MOISE, N. S.; SCOTT, F. W. Detection of astroviruses in feces of a cat with diarrhea. Brief report. **Arch. Virol.**, v.70, p.373–376, 1981.

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

IBGE. Censo Agropecuário, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em: 20 Mar 2014.

IBGE. Censo Agropecuário, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.2012. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home>>. Acesso em: 26 Mar 2014.

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

INDIK, S.; VALICEK, L.; SMID, B.; DVORAKOVA, H.; RODAK, L. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus. **Vet. Microbiol.**, v.117, p.276–283, 2006.

JEONG, H. S.; JEONG, A.; CHEON, D. S. Epidemiology of astrovirus infection in children. **Korean J. Pediatr.**, v.55, p.77–82, 2012.

JEREZ, J. A. Diarréias virais dos bezerros: rotavirus e coronavírus. **O Biológico**, v.59, p.33-37, 1997.

JIANG, H.; HOLTZ, L. R.; BAUER, I.; FRANZ, C. J.; ZHAO, G.; BODHIDATTA, L.; SHRESTHA, S. K.; KANG, G.; WANG, D. Comparison of novel MLB-clade, VA-clade and classic human astroviruses highlights constrained evolution of the classic human astrovirus nonstructural genes. **Virology**, v.436, p.8-14, 2013.

JONASSEN, C. M.; JONASSEN, T. O.; SAIF, Y. M.; SNODGRASS, D. R.; USHIJIMA, H.; SHIMIZU, M.; GRINDE, B. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. **J. Gen. Virol.**, v.82, p.1061–1067, 2001.

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

KAPOOR, A. L. L.; VICTORIA, J.; ODERINDE, B.; MASON, C.; PANDEY, P.; ZAIDI, S. Z.; DELWART, E. Multiple novel astrovirus species in human stool. **J. Gen. Virol.**, v.90, p.2965–2972, 2009.

KIANG, D.; MATSUI, S. M. Proteolytic processing of a human astrovirus nonstructural protein. **J. Gen. Virol.**, v.83, p.25–34, 2002.

KJELDSBERG, E.; HEM, A. Detection of astroviruses in gut contents of nude and normal mice. Brief report. **Arch. Virol.**, v.84, p.135–140, 1985.

KOCI, M. D.; MOSER, L. A.; KELLEY, L. A.; LARSEN, D.; BROWN, C. C.; SCULTZCHERRY, S. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. **J. Virol.**, v.77, p.11798-11808, 2003.

KOCI, M. D.; SEAL, B. S.; SCHULTZ-CHERRY, S. Molecular characterization of an avian astrovirus. **J. Virol.**, v.74, p.6173–6177, 2000.

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

KURTZ, J. B.; LEE, T. W. Human astrovirus serotypes. **Lancet**, v.324, p.1405, 1984.

LAURIN, M. A.; DASTOR, M.; L'HOMME Y. Detection and genetic characterization of a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses. **Arch. Virol.**, v.156, p.2095-2099, 2011.

LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.28, p.371-409, 2002.

LEWIS, T. L.; MATSUI, S. M. An astrovirus frameshift signal induces ribosomal frameshifting in vitro. **Arch. Virol.**, v.140, p.1127-1135, 1995.

LEWIS, T. L.; MATSUI, S. M. Astrovirus ribosomal frameshifting in an infection-transfection transient expression system. **J. Virol.**, v.70, p.2869-2875, 1996.

LI, L.; DIAB, S.; MCGRAW, S.; BARR, B.; TRASLAVINA, R.; HIGGINS, R.; TALBOT, T.; BLANCHARD, P.; RIMOLDI, G.; FAHSBENDER, E.; PAGE, B.; PHAN, T. G.; WANG, C.; DENG, X.; PESAVENTO, P.; DELWART, E. Divergent astrovirus associated with neurologic disease in cattle. **Emerging Infect. Dis.**, v.19, p.1385-1392, 2013.

LUKASHOV, V. V.; GOUDSMIT, J. Evolutionary relationships among Astroviridae. **J. Gen. Virol.**, v.83, p.1397-1405, 2002.

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

MADLEY, C. R.; COSGROVE B. P. 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. **Lancet**, v.2, p.451-452, 1975.

MARSHALL, J. A.; HEALEY, D. S.; STUDDERT, M. J.; SCOTT, P. C.; KENNETT, M. L.; WARD, B. K.; GUST, I. D. Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. **Aust. Vet. J.**, v.61, p.33-38, 1984.

MARSHALL, J. A.; KENNETT, M. L.; RODGER, S. M.; STUDDERT, M. J.; THOMPSON, W. L.; GUST, I. D. Virus and virus-like particles in the faeces of cats with and without diarrhoea. **Aust. Vet. J.**, v.64, p.100-105, 1987.

MATSUI S. M.; GREENBERG H. B. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 4.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.875-893, 2001.

MATSUI, S. M.; GREENBERG, H. B. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 3.ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p.811–824, 1996.

MATSUI, S. M.; KIANG, D.; GINZTON, N.; CHEW, T.; GNIRKE, U. G. Molecular biology of astroviruses: selected highlights. In: **Novartis Found. Symp.**, v.238, p.219–236, 2001.

MÉNDEZ, E.; ARIAS, C. F. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.981–1000, 2007.

MÉNDEZ-TOSS, M.; ROMERO-GUIDO, P.; MUNGUÍA, M. E.; MÉNDEZ, E; ARIAS, C. F. Molecular analysis of a serotype 8 human astrovirus genome. **J. Gen. Virol.**, v.81, p.2891–2897, 2000.

MITCHELL, D. K. Astrovirus gastroenteritis. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.21, p.1067–1069, 2002.

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

MOSER, L. A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Pathogenesis of astrovirus infection. **Viral Immunol.**, v.18, p.4–10, 2005.

OEM, J. K.; AN, D. J. Phylogenetic analysis of bovine astrovirus in Korean cattle. **Virus Genes**, v.48, p.375-375, 2014.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; STROTHER, K. O.; MUNDT, E.; ZSAK, L.; DAY, J. M.; SPACKMAN, E. Molecular characterization of avian astroviruses. **Arch. Virol.**, v.156, p.235–244, 2011.

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. **Mol. Biol. Evol.**, v.28, p.3033–3043, 2011.

POND, S. L. K.; POSADA, D.; GRAVENOR, M. B.; WOELK, C. H.; FROST, S. D. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm. **Mol. Biol. Evol.**, v.23, p.1891–1901, 2006.

QUAN, P. L.; WAGNER, T. A.; BRIESE, T.; TORGERSON, T. R.; HORNIG, M.; TASHMUKHAMEDOVA, A.; FIRTH, C.; PALACIOS, G.; BAISRE-DE-LEON, A.;

PADDOCK, C. D.; HUTCHISON, S. K.; EGHOLM, M.; ZAKI, S. R.; GOLDMAN, J. E.; OCHS, H. D.; LIPKIN, W. I. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. **Emerging Infect. Dis.**, v.16, p.918–925, 2010.

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.

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. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.12, p.184–186, 2000.

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

RIVERA, R.; NOLLENS, H. H.; VENN-WATSON, S.; GULLAND, F. M.; WELLEHAN JUNIOR, J. F. Characterization of phylogenetically diverse astroviruses of marine mammals. **J. Gen. Virol.**, v.91, p.166–173, 2010.

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.

SHIMIZU, M.; SHIRAI, J.; NARITA, M.; YAMANE, T. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.201–206, 1990.

SIMON-LORIERE, E.; HOLMES, E. C. Why do RNA viruses recombine?. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.9, p.617–626, 2011.

SMITS, S. L.; VAN, L. M.; KUIKEN, T.; HAMMER, A. S.; SIMON, J. H.; OSTERHAUS, A. D. Identification and characterization of deer astroviruses. **J. Gen. Virol.**, v.91, p.2719–2722, 2010.

SNODGRASS, D. R.; ANGUS, K. W.; GRAY, E. W.; MENZIES, J. D.; PAUL, G. Pathogenesis of diarrhoea caused by astrovirus infections in lambs. **Arch. Virol.**, v.60, p.217–226, 1979.

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

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 Res.**, v.25, p.4876–4882, 1994.

TOFFAN, A.; JONASSEN, C. M.; DE BATTISTI, C.; SCHIAVON, E.; KOFSTAD, T.; CAPUA, I.; CATTOLI, G. Genetic characterization of a new astrovirus detected in dogs Suffering from diarrhoea. **Vet. Microbiol.**, v.139, p.147–152, 2009.

TSE, H.; CHAN, W. M.; TSOI, H. W.; FAN, R. Y. Y.; LAU, C. C. Y.; LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y.; YUEN, K. Y. Rediscovery and genomic characterization of bovine astroviruses. **J. Gen. Virol.**, v.92, p.1888–1898, 2011.

VICTORIA, M.; CARVALHO-COSTA, F. A.; HEINEMANN, M. B.; LEITE, J. P. G.; MIAGOSTOVICH, M. P. Genotypes and molecular epidemiology of human astroviruses in hospitalized children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Med. Virol.**, v.79, p.939–944, 2007.

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. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.208, p.2043–2046, 1996.

WALTER, J. E.; MITCHELL, D. K. Astrovirus infection in children. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.16, p.247–253, 2003.

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

WILLCOCKS, M. M.; CARTER, M. J.; LAIDLER, F. R.; MADELEY, C. R. Growth and characterisation of human faecal astrovirus in a continuous cell line. **Arch. Virol.**, v.113, p.73–81, 1990.

WILLIAMS JUNIOR, F. P. Astrovirus-like, coronavirus-like and parvovirus-like particles detected in diarrheal stools of beagle pups. **Arch. Virol.**, v.66, p.215–226, 1980.

WOODE, G. N.; BRIDGER, J. C. Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves. **J. Med. Microbiol.**, v.11, p.441–452, 1978.

WOODE, G. N.; GOURLEY, N. E.; POHLENZ, J. F.; LIEBLER, E. M.; MATHEWS, S. L.; HUTCHINSON, M. P. Serotypes of bovine astrovirus. **J. Clin. Microbiol.**, v.22, p.668–670, 1985.

WOODE, G. N.; POHLENZ, J. F.; GOURLEY, N. E. K.; FAGERLAND, J. A. Astrovirus and Breda virus infections of dome cell epithelium of bovine ileum. **J. Clin. Microbiol.**, v.19, p.623-630, 1984.

ZHU, H. C.; CHU, D. K.; LIU, W.; DONG, B. Q.; ZHANG, S. Y.; ZHANG, J. X.; LI, L. F.; VIJAYKRISHNA, D.; SMITH, G. J.; CHEN, H. L.; POON, L. L.; PEIRIS, J. S.; GUAN, Y. Detection of diverse astroviruses from bats in China. **J. Gen. Virol.**, v.90, p.883–887, 2009.

## APÊNDICE

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
1	288	2 meses	F	Leite	Mestiço (holandês-girnelore) / Sistema semi-intensivo	Pedregulho-SP	03/07/07		X
2	287	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
3	Macho da Vitória	2 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
4	Macho da Picanha	2 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
5	Macho da Graciosa	2 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
6	Macho da Dengosa	2 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
7	286	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
8	289	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
9	285	5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
10	Macho da Dama	5 meses	M	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - 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	Diarreia	
								Sim	Não
11	Macho da Ingrata	5 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
12	284	5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
13	Macho da Roseta	5 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
14	Macho da Figueira	5 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
15	Macho da Garça	5 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
16	280 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
17	278 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
18	279 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
19	268 vacinada	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
20	275 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
21	282 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
22	276 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
23	277 +	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
24	Filha do Martim	3 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
25	255 vaca	3 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
26	178	10 meses	F	Corte	Mestiço (guzerá, canchim e red angus) / Sistema extensivo	Claraval-MG	17/09/07		X
27	-----	7 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
28	202	13 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
29	104	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
30	270	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
31	191	10 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
32	116	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
33	271	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
34	136	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
35	155	9 meses	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
36	76	10 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
37	86	8 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
38	299	7 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
39	82	35 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
40	202	2 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
41	118	35 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
42	74	35 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
43	52	35 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
44	220	1 mês	F	idem	idem	idem	idem		X
45	245	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
46	300	4 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
47	176	3 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
48	177	3 meses	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
49	169	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
50	151	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
51	477	50 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
52	103	3 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
53	67	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
54	22	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
55	234	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
56	68	40 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
57	479	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
58	85	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
59	169	50 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
60	53	35 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
61	150	50 dias	M	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
62	61	35 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
63	192	35 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
64	Moleque	6 meses	M	idem	idem	idem	idem		X
65	1349	3 meses e 18 dias	M	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema intensivo (vacas e bezerras) e semi-intensivo (novilhas)	Jaboticabal-SP	28/09/07		X
66	1337	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
67	1340	7 meses e 12 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
68	1331	11 meses e 21 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
69	Mochada	1 ano	F	idem	idem	idem	idem		X
70	1357	15 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
71	1352	2 meses e 26 dias	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
72	1353	2 meses e 10 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
73	1354	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
74	1356	1 mês e 8 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
75	1355	1 mês e 27 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
76	1350	3 meses e 10 dias	M	idem	idem	idem	idem		X
77	1320	1 ano, 4 meses e 23 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
78	320	9 anos	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema intensivo (vacas e bezerras); Sistema semi- intensivo (novilhas)	Machado-MG	07/12/07		X
79	282	9,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
80	918	9,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
81	528	5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
82	467	6 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
83	646	2,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
84	1122	2,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
85	314	9 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
86	548	4,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
87	265	9,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
88	315	9 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
89	1121	2,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
90	629	3 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
91	709	1 ano	F	idem	idem	idem	idem		X
92	Macho	1 mês	M	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
93	1153	3 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
94	747	2,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
95	1155	2 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
96	1154	3 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
97	1151	6 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
98	744	5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
99	1152	3,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
100	730	9 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
101	1148	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
102	1149	7,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
103	741	7 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
104	742	7 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
105	1147	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
106	739	7,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
107	738	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
108	740	7 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
109	734	8,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
110	737	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
111	736	8 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
112	1146	9 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
113	727	9,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
114	733	8,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
115	725	11 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
116	728	9,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
117	724	11 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
118	720	1 ano	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
119	729	9,5 meses	F	idem	idem	idem	idem		X
120	748	1 mês	F	idem	idem	idem	idem		X
121	690	1,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
122	1135	1,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
123	704	1,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
124	685	1,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
125	692	1,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
126	696	1,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
127	1139	1,5 anos	F	idem	idem	idem	idem		X
128	01/08	35 dias	M	Leite	Holandês preto e branco/ Sistemas intensivo e semi- intensivo	Descalvado-SP	11/04/08	X	
129	02/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
130	03/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
131	05/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
132	07/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
133	09/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
134	15/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
135	16/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
136	19/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
137	20/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
138	21/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
139	22/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
140	23/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
141	24/08	35 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
142	38/08	35 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
143	39/08	15 dias	M	Corte	Mestiço (nelore, guzerá/Sistema extensivo)	Catiguá-SP	14/07/08	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
144	40/08	15 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
145	41/08	15 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
146	46/08	15 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
147	73/08	46-60 dias	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistemas intensivo e semi- intensivo	Jaboticabal-SP	03/09	X	
148	74/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
149	75/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
150	76/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
151	77/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
152	78/08	46-60 dias	M	idem	Idem	idem	idem	X	
153	79/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
154	80/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
155	81/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
156	82/08	46-60 dias	F	idem	Idem	idem	idem	X	
157	83/08	46-60 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
158	190/08	1-5 dias	F	Corte	Mestiço (Sistema extensivo)	Cassilândia- MS	04/09	X	
159	191/08	1-5 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
160	192/08	1-5 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
161	193/08	1-5 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
162	194/08	1-5 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
163	195/08	1-5 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
164	239/08	30 dias	F	Corte	Mestiço (Sistema extensivo)	Cassilândia- MS	04/09	X	
165	240/08	30 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
166	241/08	30 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
167	242/08	30 dias	M	idem	idem	idem	Idem	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
168	243/08	30 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
169	244/08	30 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
170	272/08	60 dias	M	Corte	Mestiço (Sistema extensivo)	Buritis-RO	04/09	X	
171	273/08	60 dias	M	idem	idem	idem	Idem	X	
172	274/08	60 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
173	275/08	60 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
174	284/08	16-20 dias	M	Corte	Angus (Sistema extensivo)	Serranópolis-GO	04/09	X	
175	285/08	16-20 dias	M	idem	idem	idem	Idem	X	
176	286/08	16-20 dias	M	idem	idem	idem	Idem	X	
177	288/08	16-20 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
178	BRU	45 dias	M	Leite	Holandês preto e branco/sistema semi-intensivo	Descalvado-SP	17/1/2012	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
179	CHA	60 dias	M	idem	Idem	idem	Idem	X	
180	GUI	20 dias	M	idem	Idem	idem	Idem	X	
181	MEL	20 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
182	5186	15 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
183	351	14 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
184	5183	16 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
185	5187	14 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
186	5184	16 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
187	3448	10 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
188	3477	10 dias	F	idem	Idem	idem	Idem	X	
189	5177	17 dias	F	idem	idem	idem	Idem	X	
190	4945	16 dias	F	idem	idem	idem	idem	X	
191	5160	24 dias	F	idem	idem	idem	idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
192	5163	24 dias	F	idem	idem	idem	idem		X
193	JAMBO 192	10 dias	M	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema semi-intensivo	Araras-SP	28/02/2012	X	
194	UVA 193	10 dias	M	idem	idem	idem	idem	X	
195	SEU EDSON 194	10 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	
196	ABACATE 195	26 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	
197	JABOTICABA 196	10 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	
198	ARROZ 197	10 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	
199	SEU HUDSON 198	10 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	
200	01	30 dias	F	Leite	Holandês preto e branco/ Sistema semi-intensivo	Rosário do Sul/RS	20/10/2009	X	
201	02	30 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
202	03	30 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
203	04	30 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
204	05	30 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
205	01	20 dias	M	Corte	Mestiço (Sistema extensivo)	Jataí/GO	03/11/2009	X	
206	02	20 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
207	03	20 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
208	01	21 dias	M	Corte	Angus	Pato Branco/PR	29/10/2009	X	
209	02	35 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
210	03	36 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
211	01	60 dias	F	Leite	Jersey/Holandês Sistema semi-intensivo	Tibagi/PR	12/11/2009	X	
212	02	45 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
213	03	45 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
214	04	40 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
215	05	40 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
216	06	40 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
217	07	40 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
218	08	45 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
219	09	45 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
220	10	45 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
221	01	30 dias	M	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Pato Branco/PR	25/10/2009	X	
222	02	35 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
223	03	40 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
224	04	150 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
225	05	140 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
226	06	90 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
227	07	90 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
228	S60	60 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010		X
229	S61	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
230	S62	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
231	S63	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
232	S64	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
233	S65	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
234	S66	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
235	S67	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
236	S68	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
237	S69	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
238	570	60 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010		X
239	571	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
240	572	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
241	573	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
242	574	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
243	575	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
244	524	60 dias	F	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Carmo do Cajuru/MG	05/07/2010	X	
245	525	35 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem		X
246	526	45 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
247	527	58 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
248	528	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
249	529	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
250	530	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
251	531	1 semana	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
252	532	1 semana	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
253	533	51 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
254	534	1 semana	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
255	535	60 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
256	536	58 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem		X
257	537	20 dias	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
258	538	1 semana	M	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
259	539	1 semana	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
260	540	27 dias	F	Idem	Idem	Idem	Idem	X	
261	683	15 dias	M	Leite	Holandês/ Sistema semi-intensivo	Lins/SP	18/07/2010	X	
262	684	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	
263	685	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	
264	686	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	
265	687	15 dias	M	Idem	idem	Idem	Idem	X	

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (continuação).

Número Cadastro	Nome/Número	Idade	Sexo	Aptidão	Raça / Sistema de Criação	Município	Data de colheita	Diarreia	
								Sim	Não
266	688	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	
267	689	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	
268	690	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	
269	691	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	
270	692	15 dias	F	Idem	idem	Idem	Idem	X	
271	Juliana 01	> 2 anos	F	Leite	Holandês/Sistema semi-intensivo	Leme-SP	15/05/2013	X	
272	Juliana 02	> 2 anos	F	Leite	idem	idem	idem	X	

M= Masculino F= Feminino Idem= Idêntico

Quadro 5 - Relação dos animais amostrados em propriedades da região centro-sul do Brasil, segundo as características investigadas (conclusão).