

**CARLA MENEGUIN BARBOSA**

**Análise filogenética dos coronavírus aviários isolados  
em diferentes regiões do Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo  
2019

## RESUMO

BARBOSA, C.M. Análise filogenética dos coronavírus aviários isolados em diferentes regiões do Brasil. 2019. 70f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O desmatamento e as mudanças de ambiente causadas pelo homem levam a drásticas alterações dos padrões de migração das aves. A contínua perda e fragmentação do habitat ao longo dos corredores das grandes rotas migratórias criam gargalos, resultando em superpopulação e aglomerados de espécies contribuem para aquisição e carreamento de diferentes patógenos ao longo destas rotas, incluindo os coronavírus (CoVs). Maiores vírus de RNA conhecidos, os CoVs possuem grande capacidade de se adaptar a novos hospedeiros e nichos ecológicos, sendo a emergência dos vírus causadores da SARS e da MERS, a partir de vírus de morcegos, os exemplos mais notáveis. Apesar de sua relevância e da complexidade destes agentes, são escassos os estudos de detecção e caracterização genética destes vírus, em especial em aves selvagens. Desta forma este trabalho visa detectar, analisar e discutir a diversidade destes agentes em aves nos locais de parada e internada de aves migratórias. Para tal, 852 amostras aviárias provenientes de diferentes regiões do Brasil foram submetidas a extração de RNA total seguida das reações de Transcrição Reversa (RT), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR, com primers que têm como alvo uma região do ORF 1ab codificante do gene da R<sub>p</sub>Rd viral, e os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose. Deste total, 15 apresentaram resultados positivos para CoVs sendo que em 5 delas foi possível a confirmação por sequenciamento pelo método de Sanger. Adicionalmente, outras 6 amostras de CoVs de um estudo anterior\*, foram analisadas visando dar continuidade nos estudos de caracterização viral. Na análise filogenética das sequências da região da ORF 1ab destas 11 amostras, 3 delas se agruparam com o gênero dos *Deltacoronavírus*. Este grupo tem especial importância por ter um reconhecido potencial de transmissão e emergência de aves para mamíferos, a exemplo do PorCoV HKU15, associado a surtos fatais em suínos. As 8 demais amostras foram agrupadas com o gênero dos *Gammacoronavírus*, ao qual pertence o vírus causador da doença da Bronquite Infecciosa em galinhas, o mais conhecido CoV aviário, causador de grandes perdas econômicas, que se desenvolve no trato respiratório, reprodutor, gastrointestinal e rins. Com a finalidade de obter sequências também de outras regiões do vírus, foi possível a submissão de 6 destas amostras à plataforma Ion Torrent S5™ System. Duas delas

resultaram em sequências das regiões N e 3'UTR, que não somente confirmaram o agrupamento destas amostras com o gênero dos *Gammacoronavirus*, mas também demonstraram a proximidade destes ao vírus causador da Bronquite Infecciosa em galinhas. Este trabalho demonstrou presença de Coronavírus em amostras de aves silvestres e domésticas em diversos pontos das rotas migratórias brasileiras e a caracterização de algumas destas amostras, colaborando assim para o entendimento da epidemiologia deste agente.

“Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil” \*

**PALAVRAS-CHAVE:** Coronavírus. Aves silvestres. Aves domésticas. Aves migratórias. Brasil.

## ABSTRACT

BARBOSA, C.M. Phylogenetic analysis of avian coronaviruses isolated in different regions of Brazil. 2019 70p. (Ph.D. thesis in Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Deforestation and man-made changes in the environment lead to drastic changes in bird capture patterns. Continuous habitat loss and fragmentation along the corridors of major migratory routes creates bottlenecks, resulting in overpopulation and clusters of species contributing to the acquisition and creation of different pathogens in recent periods, including CoVs. Largest known RNA viruses, CoVs have a great ability to adapt new hosts and ecological niches, being the SARS and MERS viruses, both that emerged from bat viruses, the most notable examples. Despite the relevance and complexity of these agents, studies on the detection and genetic characterization of these viruses are scarce, especially in wild birds. Thus, this paper aims to detect, analyze and discuss the diversity of these agents in birds at migratory bird stop and wintering sites. Despite the relevance and the complexity of these agents, studies on the detection and genetic characterization of these viruses are scarce, especially in wild birds. Thus, this work aims to detect, analyze and discuss the diversity of these agents in birds at migratory stop and wintering sites. Therefore, 852 avian samples from different regions of Brazil were subjected to total RNA extraction followed by Reverse Transcription (RT), Polymerase Chain Reaction (PCR) and Nested-PCR reactions, with primers targeting one region. ORF 1ab coding for the viral RpRd gene, and the results were visualized by agarose gel electrophoresis. Of this total, 15 showed positive results for CoVs and in 5 of them it was possible to confirm by sequencing by the Sanger method. Additionally, 6 other CoV samples from a previous study \* were analyzed to continue viral characterization studies. In the phylogenetic analysis of the ORF 1ab region sequences of these 11 samples, 3 of them were grouped with the *Deltacoronavirus* genus. This group is of particular importance because it has a recognized potential for transmission and emergence from poultry to mammals, such as PorCoV HKU15, associated with fatal swine outbreaks. The remaining 8 samples were grouped with the genus *Gammacoronavirus*, to which belongs the virus that causes infectious bronchitis disease in chickens, the best known avian CoV, which causes great economic losses, which develops in the respiratory, reproductive, gastrointestinal and kidney tract. . In order to obtain sequences also from other regions of the virus, it was possible to submit 6 of these samples to the Ion Torrent S5™ System platform. Two of

them resulted in sequences from the N and 3'UTR regions, which not only confirmed the grouping of these samples with the Gammacoronavirus genus, but also demonstrated their proximity to the infectious bronchitis virus in chickens. This work demonstrated the presence of coronaviruses in wild and domestic bird samples in several points of the Brazilian migratory routes and the characterization of some of these samples, thus contributing to the understanding of the epidemiology of this agent.

“Coronavirus in wild and domestic birds from different regions of Brazil” \*

**KEYWORDS:** Coronavirus. Wild birds. Domestic birds. Migratory birds. Brazil.

## INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial em termos de biodiversidade de aves, sendo inclusive rota de muitas espécies migratórias, que se deslocam, regular e sazonalmente, entre seu local de reprodução e uma ou mais áreas distintas. Ao longo destes trajetos, as aves utilizam diversas áreas para descanso e alimentação, que são de grande importância para manutenção do seu ciclo de vida e, conseqüentemente, de suas populações (REED et al., 2003). Um exemplo disso são os maçaricos e batuínas provenientes da América do Norte, que vêm ao país durante o verão e retornam aos seus locais de reprodução (Estados Unidos e Canadá) quando o inverno chega (VALENTE et al., 2011).

Diversos aspectos das migrações a longas distâncias contribuem para aquisição de patógenos por estes animais, dos quais podem ser citados o estresse associado às migrações, um conhecido fator de risco por causar imunossupressão aumentando, portanto, a susceptibilidade às doenças infecciosas (REED, 2003), o desmatamento e as mudanças de ambiente causadas pelo homem que causam drásticas mudanças aos padrões de migração. A contínua perda e fragmentação do habitat nos locais de parada ao longo dos corredores das grandes rotas migratórias criam gargalos, resultando em superpopulação e aglomerados de espécies. Representamentos artificiais de água podem ainda alterar esses corredores de migração criando novos pontos de parada para aves aquáticas. (PINTO, 2002).

Se, por um lado, os hospedeiros migratórios podem transportar patógenos para diferentes áreas, por outro, temos os hospedeiros residentes, que podem atuar como amplificadores locais bem como transmitir doenças circulantes no local estas aves recém-chegadas. Neste cenário, as aves residentes atuam como reservatórios nas suas respectivas populações e transmitindo-os a outros hospedeiros (VERHAGEN, 2014).

Líder mundial na exportação de carne de frango, o Brasil produziu 13.000.000 toneladas somente em 2017, sendo a avicultura uma das atividades que mais contribuem para o PIB do país (ABPA, 2018). Por esta razão, a introdução de novas doenças aviárias pode ser catastrófica, não só em termos da conservação da biodiversidade, mas também econômico, a exemplo do ocorrido nos Estados Unidos em 2015, quando uma epidemia de influenza aviário de alta patogenicidade matou mais de 43 milhões de aves em 15 estados diferentes com grande impacto nos anos que se seguiram. Coincidentemente, as regiões sul e sudeste do Brasil são as maiores produtoras de aves, de corte e de postura

(ABPA, 2018), e também onde se encontram os principais pontos de parada de aves migratórias do país (ICMBio, 2016).

Um dos patógenos de grande importância que podem ser dispersos por estas aves são os Coronavírus (CoVs), uma família de vírus envelopados com RNA de fita simples (ssRNA) e senso positivo, conhecidos desde meados de 1930 (CAVANAGH, 2007). Entre os CoVs aviários, o mais conhecido e que causa maiores perdas é o *Gammacoronavirus* causador da Bronquite Infecciosa, que inicialmente infecta o trato respiratório, onde se restringe às células ciliares e produtoras de muco. Posteriormente, concentrações similares de vírus são encontradas nos pulmões e sacos aéreos e, com a perda dos cílios do epitélio, é comum o aparecimento de infecções bacterianas secundárias. Este vírus pode ainda se desenvolver ainda em outras células epiteliais como os rins (causando nefrite grave), oviduto, testis e trato gastrointestinal: esôfago, proventrículo, duodeno, jejuno, Bursa de Fabrícus, tonsilas cecais, reto e cloaca (FENG et al., 2012).

Os CoVs são conhecidos pela capacidade de se adaptar a novos hospedeiros e nichos ecológicos (CHAN et al., 2013). Além grupo dos *Gammacoronavirus* uma grande variedade de cepas e genótipos de *Deltacoronavirus* já foram detectados em aves (WOO et al., 2012). Pertencente a este grupo, o PorCoV HKU15, foi associado a surtos fatais em suínos revelando o potencial de transmissão de aves para mamíferos e emergência dos CoVs (LAU et al., 2018).

Apesar de sua relevância, são escassos os estudos de detecção e caracterização genética dos CoVs, em especial em aves selvagens. Este trabalho tem o propósito de detectar estes agentes e mediante análise filogenética de suas sequências nucleotídicas, analisar e discutir a diversidade viral encontrada, colaborando para o entendimento da epidemiologia dos CoVs.

## CONCLUSÃO

Através deste estudo, conclui-se que:

a) Foi demonstrada a presença de coronavírus em amostras de aves silvestres e domésticas em diversos pontos das rotas migratórias brasileiras.

b) Não foi possível realizar o sequenciamento do genoma completo, entretanto, as regiões sequenciadas permitiram a classificação de *Deltacoronavírus* e *Gammacoronavírus* bem como a tipagem deste último.

c) Estudo filogenético das sequências obtidas demonstraram que as amostras de coronavírus detectadas estão agrupadas com outras descritas em aves, em diversas localidades do mundo, diferenciaram-se em clados que contém apenas elas. Todas as amostras em que foram detectados CoVs pertenciam a aves que circulam ou residem em pontos de parada e invernada das rotas migratórias brasileiras do Atlântico e do Brasil Central.

Apesar dos Coronavírus encontrados não representarem risco direto à saúde humana, eles podem causar doenças em aves e, no caso dos *Deltacoronavírus*, possivelmente em outros animais. A proximidade das regiões urbanas e de granjas avícolas, portanto é um fator que deve ser considerado nos programas voltados à sanidade avícola em nosso país.

## REFERÊNCIAS\*

- ARAÚJO J, PETRY MV, FABRIZIO T, WALKER D, OMETTO T, THOMAZELLI LM, SCHERER AL, SERAFINI PP, NETO IS, KRAUSS S, WEBSTER RG, WEBBY RJ, DURIGON EL. Migratory birds in southern Brazil are a source of multiple avian influenza virus subtypes. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018;12(2):220-231. DOI: 10.1111/irv.12519.
- ARDUI S, AMEUR A, VERMEESCH JR, HESTAND MS. Single molecule real-time (SMRT) sequencing comes of age: applications and utilities for medical diagnostics. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(5):2159-2168. DOI: 10.1093/nar/gky066.
- Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA). Relatório Anual 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018>>. Acesso em: 02 Set. 2019.
- BANDE F, ARSHAD SS, OMAR AR, BEJO MH, ABUBAKAR MS, ABBA Y. Pathogenesis and Diagnostic Approaches of Avian Infectious Bronchitis. *Adv Virol*. 2016;20:1462-1659. DOI: 10.1155/2016/4621659.
- BARBOSA, C. M. Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil. 2015. 65 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.
- BELOUZARD S, MADU I, WHITTAKER GR. Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain. *J Bio Chem*. 2010. 285(30): 22758–22763. DOI: 10.1074/jbc.M110.103275.
- BERGMANN CC, LANE TE, STOHLMAN SA. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4(2): 121–132. DOI:10.1038/nrmicro1343.
- BERGER MF, MARDIS ER. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(6):353-365. DOI: 10.1038/s41571-018-0002-6.
- BESERRA LA, BARBOSA BR, BERNARDES NTCG, BRANDÃO PE, GREGORI F. Occurrence and characterization of rotavirus A in broilers, layers, and broiler breeders from Brazilian poultry farms. *Avian Dis*. 2014;58(1):153-157. DOI:10.1637/10626-080513-ResNote.1
- CARDOSO TC, TEIXEIRA MCB, GOMES DE, JEREZ AJ. Genetically diverse coronaviruses in captive bird populations in a Brazilian zoological park. *Vector Borne and Zoonotic Dis*. 2011; 11(2): 165–168. DOI: 10.1089/vbz.2010.0090.
- CAVANAGH D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res*. 2007; 38(1):281–297. DOI:10.1051/vetres:2006055.
- Center for Disease Control (CDC). SARS Update—May 19,2004. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/sars/media/2004-05-19.html>>. Acesso em: 25/08/2019.
- CHAFEKAR A, FIELDING BC. MERS-CoV: Understanding the Latest Human Coronavirus Threat. *Viruses*. 2018. 10(2):1-22. DOI: 10.3390/v10020093.
- CHAMINGS A, NELSON TM, VIBIN J, WILLE M, KLAASSEN M, ALEXANDERSEN S. Detection and characterization of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. *Sci Rep*. 2018 Apr 13;8(1):5980. DOI: 10.1038/s41598-018-24407-x.
- CHAN JFW, TO KKW, TSE, H, JIN DY, YUEN KY. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. *Trends in Microbiol*. 2013; 21(10):544-555. DOI 10.1016/j.tim.2013.05.005.

CHEN GQ, ZHUANG QY, WANG KC, LIU S, SHAO JZ, JIANG WM, HOU GY, LI JP, YU JM, Li, YP, CHEN, JM. Identification and Survey of a Novel Avian Coronavirus in Ducks. *PLoS ONE*. 2003;8(8):1-9.

CHEUNG PP, LEUNG YHC, CHOW CK, NG CF, TSANG CL, WU YO, MA SK, SIA SF, GUAN Y, PEIRIS JSM. Identifying the species-origin of faecal droppings used for avian influenza virus surveillance in wild-birds. *Journal of Clin Virol*. 2009; 46(1):90–93. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.06.016.

CHOI KY, LEE TK, SUL WJ. Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens - A Review. *Asian-Australas J Anim Sci*. 2015;28(9):1217-25. DOI: 10.5713/ajas.15.0026.

CHU DKW, LEUNG CYH, GILBERT M, JOYNER PH, NG EM, TSE TM, GUAN Y, PEIRIS JSM, POON, LLM. Avian Coronavirus in Wild Aquatic Birds. *J.Virol*, 2011;85(23):12815-12820. DOI: 0.1128/JVI.05838-11.

CONCEIÇÃO-NETO N, ZELLE M, LEFRÈRE H, DE BRUYN P, BELLER L, DEBOUTTE W, YINDA CK, LAVIGNE R, MAES P, VAN RANST M, HEYLEN E, MATTHIJNSSENS J. Modular approach to customise sample preparation procedures for viral metagenomics: a reproducible protocol for virome analysis. *Sci Rep*. 2015;5:16532. DOI:10.1038/srep16532.

DEAMER D, AKESON M, BRANTON D. Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):518-24. DOI: 10.1038/nbt.3423.

DE GROOT RJ, BAKER SC, BARIC RS, BROWN CS, DROSTEN C, ENJUANES L, FOUCHIER RAM, GALIANO M, GORBALENYA AE, MEMISH Z, PERLMAN S, POON LLM, SNIJDER EJ, STEPHENS GM, WOO PCY, ZAKI AM, ZAMBON M, ZIEBUHR J. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV); Announcement of the Coronavirus Study Group. *J Virol*. 2013;5:13–15. DOI: 10.1128/JVI.01244-13.

DUDAS G, CARVALHO LM, RAMBAUT A, BEDFORD T. MERS-CoV spillover at the camel-human interface. *Elife*. 2018;16(7):1-23. DOI: 10.7554/eLife.31257.

DURÃES-CARVALHO R, MARTINI MC, FERREIRA HL, FELIPPE PAN. Coronaviruses Detected in Brazilian Wild Birds Reveal Close Evolutionary Relationships with Beta- and Deltacoronaviruses Isolated From Mammals. *J Mol Evol*. 2015;811:21-3. DOI: 10.1007/s00239-015-9693-9.

EYBPOOSH S, FAZLALIPOUR M, BANIASADI V, POURIAYEVALI MH, SADEGHI F, AHMADI-VASASMEHJANI A, KARBALAEI-NIYA MH, HEWSON R, SALEHI-VARIZINI M. Epidemiology of West Nile Virus in the Eastern Mediterranean region: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(1):1-15. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007081.

FEHR AR, PERLMAN S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol Biol*, 2016;1282(1):1-23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7.

FELLAHI S, HARRAK MEL, DUCATEZ M, LOUTFI C, IBN S, KORAICHI S, KUHN JH, KHAYI S, HOUADFI MEL ENNAJI MM. Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus S1 glycoprotein regions reveals emergence of a new genotype in Moroccan broiler chicken flocks. *Virol J*. 2015.12(16): 1–8, DOI: 10.1186/s12985-015-0347-8.

FENG J, HU Y, MA Z, YU Q, ZHAO J, LIU X, ZHANG G. Virulent Avian Infectious Bronchitis Virus, People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(1):12. DOI:10.3201/eid1812.120552.

GÓES LGB. Caracterização Molecular de Coronavírus Humano - HCoV, circulantes no município de São Paulo, São Paulo, Brasil. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2012.

GRAHAM RL, BARIC RS. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. *J Virol*. 2010; 84(7):3134-3146. DOI: 10.1128/JVI.01394-09.

HAGEMEIJER, M. C.; ROTTIER, P. J. M.; DE HAAN, C. a M. Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. *Viruses*. 2012;4(11):3245-3269. DOI:10.3390/v4113245.

HEALD-SARGENT, T.; GALLAGHER, T. Ready, set, fuse! the coronavirus spike protein and acquisition of fusion competence. *Viruses*. 2012;4(4):557-580. DOI:10.3390/v4040557.

HEATHER JM, CHAIN B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016;107(1):1-8. DOI: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.

HONKAVUORI KS, BRIESE T, KRAUSS S, SANCHEZ MD, JAIN K, HUTCHISON SK, WEBSTER RG, LIPIKIN WI. Novel coronavirus and astrovirus in Delaware Bay shorebirds. *PLoS One*. 2014;9(4):1-5 DOI: 10.1371/journal.pone.0093395.

HUANG X, HAN K, ZHAO D, LIU Y, ZHANG J, NIU H, ZHANH K, ZHU J, WU D, GAO L, Li Y. Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from geese in China. *Res Vet Sci*. 2013;94(3):774-80. DOI 10.1016/j.rvsc.2012.11.014.

HURST KR, YE R, GOEBEL SJ, JAYARAMAN P, MASTERS PS. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. *J Virol*. 2010;84(19):10276-10288. DOI: 10.1128/JVI.01287-10.

Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio). Relatório Anual de Rotas e Áreas de Concentração de aves migratórias no Brasil. CEMAVE/ICMBio. 2016.

Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio). Relatório Anual de Rotas e Áreas de Concentração de aves migratórias no Brasil. CEMAVE/ICMBio. 2014.

International Comitee for Virus Taxonomy (ICTV). 10<sup>th</sup> Report. 2018. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org>> Acesso em: 05/08/2019.

JAHN AE, LEVEY DJ, CUETO VR, LEDEZMA JP, TUERO DT, FOX W, MASSON D. Long-Distance Bird Migration within South America Revealed by Light-Level Geolocators. *Am Ornith Soc*. 2013;130(2):223–229. DOI: 10.1525/auk.2013.12077.

JAYARAM H, FAN H, BOWMAN BR, OOI A, JAYARAM J, COLLISSON EW, LESCAR J, PRASAD BVV. X-Ray Structures of the N- and C-Terminal Domains of a Coronavirus Nucleocapsid Protein: Implications for Nucleocapsid Formation. *J Virol*. 2006; 80(13):6612-6620. DOI:10.1128/JVI.00157-06.

JOHNE R, OTTO P, ROTH B, LÖHREN U, BELNAP D, REETZ J, TROJNAR E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. *Virology*. 2011;442:384-439. DOI: 10.1016/j.virol.2011.01.031.

KOPECKY-BROMBERG SA, MARTÍNEZ-SOBRIDO L, FRIEMAN M, BARIC RA, PALESE P. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J Virol*. 2007;81(2): 548–557. DOI: 10.1128/JVI.01782-06.

KUO L, HURST-HESS KR, KOETZNER CA, MASTERS PS. Analyses of Coronavirus Assembly Interactions with Interspecies Membrane and Nucleocapsid Protein Chimeras. *J Mol Evol*. 2016;90(9):4357-4368. DOI: 10.1128/JVI.03212-15.

KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 2018;35(6):1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.

LAU SKP, WONG EYM, TSANG CC, AHMED SS, AU-YUEN KY, WERNERY U, WOO PCY. Discovery and Sequence Analysis of Four Deltacoronaviruses from Birds in the Middle East Reveal

Interspecies Jumping with Recombination as a Potential Mechanism for Avian-to-Avian and Avian-to-Mammalian Transmission. *J Virol.* 2018;92(15):1-18. DOI:10.1128/JVI.00265-18.

LEI W, GUO X, FU S, FENG Y, TAO X, GAO X, SONG J, YANG Z, ZHOU H, LIANG G. The genetic characteristics and evolution of Tembusu virus. *Vet Microbiol.* 2017;201:32-41. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.01.003.

LEVENE MJ, KORLACH J, TURNER SW, FOQUET M, CRAIGHEAD HG, WEBB WW. Zero-mode waveguides for single-molecule analysis at high concentrations. *Science.* 2003;31:682-686. DOI:10.1126/science.1079700.

LI F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *J Virol.* 2015;89(4):1954-1964. DOI: 10.1128/JVI.02615-14.

LI S, LI X, ZHANG L, WANG Y, YU X, TIAN K, SU W, HAN B, SU J. Duck Tembusu virus exhibits neurovirulence in BALB/c mice. *Virol J.* 2013;10:260. DOI: 10.1186/1743-422X-10-260.

LIAIS E, CROVILLE G, MARIETTE J, DEVERDIER M, LUCAS MN, KLOPP C, LLICH J, DONNADIEU C, GUY JS, CORRAND L, DUCATEZ MF, GUÉRIN JL. Novel avian coronavirus and fulminating disease in guinea fowl, France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(1):105-8. DOI: 10.3201/eid2001.130774.

LIU M, CHEN S, CHEN Y, LIU C, CHEN S, YIN X, LI G, ZHANG Y. Adapted Tembusu-like virus in chickens and geese in China. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2807-2809. DOI: 10.1128/JCM.00655-12.

LOPES N, NOZAWA C, LINHARES REC. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude.* 2014;5(3):55-64. DOI: 10.5123/S2176-62232014000300007.

LUO C, TSEMENTZI D, KYRPIDES N, READ T, KONSTANTINIDIS KT. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample. *PLoS One.* 2012;7(2):1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0030087.

LYNCETT SJ, DUCHATEL F, DIGARD P. A brief history of bird flu. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2019;374(1775):1-7. DOI: 10.1098/rstb.2018.0257.

MAEDA J, REPASS JF, MAEDA A, MAKINO S. Membrane topology of coronavirus E protein. *Virology.* 2001;281(2):163-169. DOI:10.1006/viro.2001.0818.

MANTERE T, KERSTEN S, HOISCHEN A. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet.* 2019;10:426. DOI:10.3389/fgene.2019.00426.

MATTHIJNSSENS J, VAN RANST M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2012;2(4):426-433. DOI: 10.1016/j.coviro.2012.04.007.

MCBRIDE R, VAN ZYL M, FIELDING B. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. *Viruses.* 2014;6(8):2991-3018. DOI: 10.3390/v6082991.

MCCOMBIE WR, MCPHERSON JD, MARDIS ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018; DOI:10.1101/cshperspect.a036798.

MCNULTY MS, ALLAN GM, TODD D, MCFERRAN JB, MCKILLOP ER, COLLINS DS, MCCRACKEN RM. Isolation of rotaviruses from turkeys and chickens: demonstration of distinct serotypes and RNA electropherotypes. *Avian Pathol.* 1980;9:363-375. DOI: 10.1080/03079458008418420.

MICHEL F, FISCHER D, EIDEN M, FAST C, REUSCHEL M, MULLER K, RINDER M, URBANIAK S, BRANDES F, SCHWEHN R, LUNKEN R, GROSCHUP MH, ZIEGLER U. West Nile Virus and Usutu Virus Monitoring of Wild Birds in Germany. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(1):171. DOI: 10.3390/ijerph1501017.

MILEK J, Blicharz-Domanska K. Coronaviruses in Avian Species - Review with Focus on

Epidemiology and Diagnosis in Wild Birds. *J Vet Res.* 2018;62(3):249-255. DOI: 10.2478/jvetres-2018-0035.

NEWTON, I. Part One: The Migration Patterns. NEWTON, I. *The Migration Ecology of Birds.* 1ª edição. EUA, 2007.

NGA VT, NGOC TU, MINH LB, NGOC VTN, PHAM VH, NGHIA LL, SON NLH, Van PHAM TH, BAC ND, TIEN TV, TUAN NNM, TAO Y, SHOW PL, CHU DT. Zoonotic diseases from birds to humans in Vietnam: possible diseases and their associated risk factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(6):1047-1058. DOI:10.1007/s10096-019-03505-2.

NARAYANAN K, MAEDA A, MAEDA J, MAKINO S. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. *J Virol.* 2000;74(17):8127–8134. DOI: 10.1128/jvi.74.17.8127-8134.2000.

NOOIJ S, SCHMITZ D, VENNEMA H, KRONEMAN A, KOOPMANS MPG. Overview of Virus Metagenomic Classification Methods and Their Biological Applications. *Front Microbiol.* 2018;9:749. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00749.

OSUNMAKINDE CO, SELVARAIAN R, SIBANDA T, MAMABA BB, MSAGALI TAM. Overview of Trends in the Application of Metagenomic Techniques in the Analysis of Human Enteric Viral Diversity in Africa's Environmental Regimes. *Viruses.* 2018;10(8):429. DOI: 10.3390/v10080429.

PLANT EP, DINMAN JD. The role of programmed-1 ribosomal frameshifting in coronavirus propagation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2008.13:4873–4881. DOI: 10.2741/3046.

PERLMAN S, NETLAND J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7(6):439-50. DOI: 10.1038/nrmicro2147.

PINTO CDO. *As grandes migrações continentais.* 2002. 29 f. Dissertação. Faculdade de Ciências da Saúde. Centro Universitário de Brasília. Brasília, 2002.

PATEL RK, JAIN M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data. *PLoS One.* 2012;7(2):1-7. DOI: 10.1371/journal.pone.0030619.

REED KD, MEECE JK, HENKEL JS, SHUKLA SK. Birds, migration and emerging zoonoses: west nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. *Clin Med Res.* 2003;1(1): 5–12.

SANTOS MPD. Capítulo I. VALENTE, RM., SILVA, J.M.C., STRAUBE, F.C. and NASCIMENTO, J.L.X. *Conservação de aves migratorias nearticas no Brasil .1ª edição.* Brasil. Conservação Internacional, 2011.

SMITHBURN KC, BUGHER JC. Ultrafiltration of recently isolated neurotropic viruses. *J Bacteriol.* 1953;66(2):173-177.

SUN X, LIU E, IQBAL A, WANG T, WANG X, HASEEB A, AHMED N, YANG P, CHEN Q. The Dynamic distribution of duck Tembusu virus in the spleen of infected shelducks. *BMC Vet Res.* 2019;15(1):112. DOI: 10.1186/s12917-019-1860-6.

SIU K, CHAN C, KOK K, WOO PC, JIN D. Suppression of innate antiviral response by severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein is mediated through the first transmembrane domain. *Cel Mol Immunol.* 2014.11 (2): 141-149. DOI:10.1038/cmi.2013.61.

SATIJA N, LAL SK. The molecular biology of SARS coronavirus. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007; 1102: 26-38. DOI: 10.1196/annals.1408.002

SLATKO BE, GARDNER AF, AUSUBEL FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol.* 2018;122(1):5-9. DOI: 10.1002/cpmb.59.

SEDLAZECK FJ, LEE H, DARBY CA, SCHATZ MC. Piercing the dark matter: bioinformatics of long-range sequencing and mapping. *Nat Rev Genet.* 2018;19(6):329-346. DOI: 10.1038/s41576-018-0003-4.

SHANG N, ZHU Q, DAI M, ZHAO G. Complete Genome Sequence of the Heavy-Metal-Tolerant Endophytic Type Strain of *Salinicola tamaricis*. *Genome Announc.* 2018;19:1-2. DOI: 10.1128/genomeA.00358-18.

TANG Y, CHEN H, DIAO Y. Advanced uracil DNA glycosylase-supplemented real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (UDG-rRT-LAMP) method for universal and specific detection of Tembusu virus. *Scientific reports.* 2016;6:27605. DOI: 10.1038/srep27605.

TANG J, BI Z, DING M, YIN D, ZHU J, ZHANG L, MIAO Q, ZHU Y, WANG G, LIU G. Immunization with a suicidal DNA vaccine expressing the E glycoprotein protects ducklings against duck Tembusu virus. *Virology.* 2018;15(1):140. DOI: 10.1186/s12985-018-1053-0.

TANG Y, DIAO Y, CHEN H, OU Q, LIU X, GAO X, YU C, WANG L. Isolation and genetic characterization of a tembusu virus strain isolated from mosquitoes in Shandong, China. *Transbound Emerg Dis.* 2015;62(2):209-216. DOI:10.1111/tbed.12111.

TEMMAM S, DAVOUST B, BERENGER JM, RAOULT D, DESNUES C. Viral metagenomics on animals as a tool for the detection of zoonoses prior to human infection? *Int J Mol Sci.* 2014;15(6):10377-10397. DOI: 10.3390/ijms150610377.

TROJNAR E, SACHSENROEDER J, TWARDZIOK S, JOCHEN R, OTTO PH, JOHNE R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. *J Gen Virol.* 2013; 94:136-142. DOI: 10.1099/vir.0.047381-0.

UJIKE M, HUANG C, SHIRATO K, MAKINO S, TAGUCHI F. The contribution of the cytoplasmic retrieval signal of severe acute respiratory syndrome coronavirus to intracellular accumulation of S proteins and incorporation of S protein into virus-like particles. *J Gen Virol.* 2016. 97(8):1853-64. DOI: 10.1099/jgv.0.000494.

VERHAGEN JH, MAJOUR F, LEXMOND P, VUONG O, KASEMIR G, LUTTEROP D, OSTERHAUS AD, FOUCHIER RA, KUIKEN T. Epidemiology of influenza A virus among black-headed gulls, the Netherlands, 2006-2010. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(1):138-141. DOI: 10.3201/eid2001.130984.

VENKATESH D, POEN MJ, BESTEBROER TM, SCHEUER RD, VUONG O, CHKHAIKIDZE M, MACHABLISHVILI A, MAMUCHADZE J, NINUA L, FEDOROVA NB, HALPIN RA, LIN X, RANSIER A, STOCKWELL TB, WENTWORTH DE, KRITI D, DUTTA J, VAN BAKEL H, PURANIK A, SLOMKA MJ, ESSEN S, BROWN H, FOUCHIER RAM LEWIS NS. Avian Influenza Viruses in Wild Birds: Virus Evolution in a Multihost Ecosystem. *J Virol.* 2018;92(15):1-18. DOI: 10.1128/JVI.00433-18.

VAN DIJK EL, JASZCZYSZYN Y, NAQUIN D, THERMES C. The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends Genet.* 2018;34(9):666-681. DOI: 10.1016/j.tig.2018.05.008.

VIBIN J, CHAMINGS A, COLLIER F, KLAASSEN M, NELSON TM, ALEXANDERSEN S. Metagenomics detection and characterisation of viruses in faecal samples from Australian wild birds. *Sci Rep.* 2018;8(1):686. DOI: 10.1038/s41598-018-26851-1.

WOOD DE, SALZBERG SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 2014;15(3):46. DOI: 10.1186/gb-2014-15-3-r46.

WOO PCY, LAU SKP, LAM CSF, TSANG AKL, HUI SW, FAN RYY, MARTELLI P, YUEN KY. Discovery of a novel bottlenose dolphin coronavirus reveals a distinct species of marine mammal coronavirus in Gammacoronavirus. *J Virol.* 2013;88(2):1318-1331. DOI: 10.1128/JVI.02351-13.

WOO PCY, LAU SKP, LAM CSF, LAU CCY, TSANG AKL, LAU JHN, BAI R, TENG JLL, TSANG CCC, WANG M, ZHENG BJ, CHAN KH, YUEN KY. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. *J Virol.* 2012;86(7):3995-4008. DOI: 10.1128/JVI.06540-11.

WERTHEIM JO, CHU DKW, PEIRIS JSM, KOSAKOVSKY POND SL, POON LLM. A case for the ancient origin of coronaviruses. *J Virol.* 2013;87(12):7039-45. DOI: 10.1128/JVI.03273-12.

WU K, PENG G, WILKEN M, GERAGHTY RJ, LI F. Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Bio Chem.* 2012;287(12):8904-8911. DOI:10.1074/jbc.M111.325803

YU G, LIN Y, TANG Y, DIAO Y. Evolution of Tembusu Virus in Ducks, Chickens, Geese, Sparrows, and Mosquitoes in Northern China. *Viruses.* 2018;10(9):10. DOI: 10.3390/v10090485.

ZHUANG QY, WANG KC, LIU S, HOU GY, JIANG WM, WANG SC, LI JP, YU JM, CHEN JM. Genomic Analysis and Surveillance of the Coronavirus Dominant in Ducks in China. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129256. DOI: 10.1371/journal.pone.0129256.

\*De acordo com: International Comitee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from: <[http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)>