

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

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.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

Versão original

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Barbosa, Carla Meneguim

Análise filogenética dos coronavírus aviários
isolados em diferentes regiões do Brasil / Carla
Meneguim Barbosa; orientador Edison Luiz Durigon. --
São Paulo, 2019.

73 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Coronavírus. 2. Aves Silvestres. 3. Aves
Domésticas. 4. Aves Migratórias. 5. Brasil. I.
Durigon, Edison Luiz, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia

Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidata: Carla Meneguim Barbosa

Título da Tese: Análise filogenética dos coronavírus aviários isolados em diferentes regiões do Brasil

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ___ / ___ / ___, considerou:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente : Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **775/2015** referente ao projeto intitulado: "*Análise Filogenética dos Coronavírus Aviários Isolados em Diferentes Regiões do Brasil*" sob a responsabilidade de Carla Meneguim Barbosa e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Edison Luiz Durigon**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 04 de novembro de 2015

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo M. A. Zanotto**
Coordenador CEPSH ICB/USP

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Ciências Biomédicas pelas inúmeras oportunidades de aprendizado em minha vida acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade de desenvolver os projetos de mestrado e doutorado.

Ao Prof. Dr Edison Luiz Durigon pelos ensinamentos, atenção, pela confiança e por ser um exemplo de pessoa e profissional.

Ao Instituto de Pirbright e ao Doutor Muhammad Munir pela oportunidade, acolhimento e ensinamentos.

À Thermo Fisher pela disponibilização de suas instalações e suporte técnico no desenvolvimento das etapas envolvidas no sequenciamento de nova geração deste trabalho.

À todos os colegas do LVCM pela amizade e ótimos momentos que vivemos juntos.

À minha família por todo o apoio, carinho e incentivo.

À todos que contribuíram no desenvolvimento desta tese.

Finalmente, à CAPES e ao Programa de Cooperação Internacional CAPES/Newton Foundation (processo 88887.125395/2016-00) pelo suporte financeiro.

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 invernada 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 RpRd 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 *Deltacoronavirus*. 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 *Gammacoronavirus*, 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.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rotas migratórias nas Américas	15
Figura 2 Principais Rotas migratórias no Brasil	16
Figura 3: Representação esquemática da taxonomia dos CoVs	21
Figura 4: Microscopia eletrônica colorida de um Coronavírus humano 229E	22
Figura 5 Esquemática da estrutura de um coronavírus	22
Figura 6 Esquemática da proteína de nucleocapsídeo (N) de um CoV	23
Figura 7 Esquemática das Proteínas envelope (E) e de membrana (M) de um coronavírus	25
Figura 8 Esquemática da Proteína Spike (S) de um coronavírus, com suas subunidades (S1 e S2) e subdomínios de S2 HR1 e HR2	26
Figura 9 Estrutura do genoma dos coronavírus	27
Figura 10 Organização genômica de vários gêneros CoVs	28
Figura 11 Representação esquemática do genoma do Vírus da Hepatite Murina (MHV)	29
Figura 12 Ciclo celular dos coronavírus causadores da SARS e da MERS	31
Figura 13 Modelo de evolução dos coronavírus	33
Figura 14 Exemplos de transmissão de coronavírus entre hospedeiros não relacionados	34
Figura 15 Fluxograma das atividades realizadas visando a caracterização viral das amostras aviárias empregadas neste estudo	42
Figura 16 Sequência dos primers utilizados para as reações de PCR e Nested-PCR, que têm como alvo o gene da RpRd	45
Figura 17 Gel de agarose relativo à reação de Nested PCR de alíquotas retiradas dos ovos embrionados inoculados, passagens 1 e 2	48
Figura 18 Gel de agarose relativo à reação de Nested-PCR de alíquotas retiradas dos ovos embrionados inoculados, passagem 3	48
Figura 19 Mapa demonstrando a relação da localidade das amostras sequenciadas positivas para coronavírus às principais rotas migratórias do Brasil	51
Figura 20. Árvore filogenética referente à sequência de 440pb da região codificante da RpRd do ORF1ab dos coronavírus	52
Figura 21 Árvore filogenética referente às sequências da região codificante da proteína N de <i>Gammacoronavírus</i> e <i>Deltacoronavírus</i>	56
Figura 22 Árvore filogenética referente às sequências da região Não Codificante Terminal (3'UTR) dos <i>Gammacoronavírus</i>	57
Figura 23 Imagem de um Ganso Chinês (<i>Anser cygnoides</i>)	58
Figura 24 Imagem de um Talha-mar (<i>Rynchops niger</i>)	59
Figura 25: A. Imagem de uma Arara-Azul-Grande (<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>) B. Imagem de um Papagaio-verdadeiro (<i>Amazona aestiva</i>)	59
Figura 26: Imagem de um animal da espécie <i>Anas bahamensis</i> (Marreca-toicinho)	60
Figura 27: A. Maçarico-de-Sobre-Branco (<i>Calidris fuscicollis</i>). B. Maçarico-Branco (<i>Calidris alba</i>) espécie migratórias das quais foram provenientes	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Amostras positivas para coronavírus provenientes do projeto de mestrado intitulado “Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil” de acordo com o ano e localidade.....	40
Tabela 2 Localidades e número de amostras analisadas e resultados das análises de Nested-PCR das amostras coletadas durante o projeto de doutorado.....	40
Tabela 3 Número de amostras coletadas durante este estudo de acordo com a procedência, resultados das análises de Nested-PCR pelo protocolo de triagem para coronavírus e sequenciamento pelo método de Sanger.....	49
Tabela 4 Amostras positivas para coronavírus sequenciadas pelo método de Sanger no presente estudo, de acordo com o ano e localidade.....	50
Tabela 5 Quantificação do DNA das amostras utilizando o fluorímetro Qubit™ 2.0 (Invitrogen).....	53
Tabela 6 Relatório de corrida indicando qualidade do Sequenciamento de Nova Geração.....	54
Tabela 7 Vírus detectados pelo software Kraken 2 nas leituras geradas por amostra.	54
Tabela 8 Relação da identificação da amostra com o número de acesso no GenBank das sequências de coronavírus aviários selecionadas como genoma de referência, número dos nucleotídeos com relação ao genoma de referência e as respectivas posições em que se encontram.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

BCoV - CoV bovino
CBRO- Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos CCoV - Coronavírus canino
cDNA- DNA complementar
CoV- Coronavírus
DEPC - Dietil-pirocarbonato
DNA- Ácido Desoxirribonucleico
dNTP - Deoxinucleosídeo - trifosfato
et al. - E colaboradores
FCoV - Coronavírus felino
g – gramas
IBV- Vírus da Bronquite Infecciosa
ICTV- International Committee on Taxonomy of Viruses
kb - Kilobase
Km - Quilômetros
M - Molar
MERS - Síndrome Respiratória do Oriente Médio
MHV - Vírus da Hepatite Murina mL - Mililitro mM - Milimolar
NCBI- National Center for Biotechnology Information
nMol - Nanomoles
ORF - open readingframe
pb - Pares de bases
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
PhCoV - Pheasants Coronavirus
RBD - Domínios de ligação ao receptor
RNA - Ácido Ribonucleico
rpm - Rotações por minuto
RpRd - RNA-polimerase RNA dependente RT- Transcrição reversa
SARS - Síndrome Aguda Respiratória Severa
sgRNA - mRNA subgenômico
SPF- Specific Pathogens Free
ssRNA- RNA de fita simples
TCoV - Turkey Coronavirus
TGEV - Coronavírus suíno da Gastroenterite Transmissível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	144
2.1 <i>Rotas migratórias</i>	114
2.2. <i>Vírus aviários</i>	166
2.3. <i>Coronavírus aviários</i>	18
2.4. <i>Taxonomia</i>	200
2.5 <i>Estrutura do virion</i>	211
2.5.1 Proteína de nucleocapsídeo (N)	222
2.5.2 Proteína de membrana (M) e de envelope (E)	244
2.5.3 Proteína de espícula (S)	25
2.5.4 Hemaglutinina esterase (HE)	266
2.6 <i>Genoma</i>	277
2.7 <i>Ciclo de replicação</i>	28
2.8 <i>Receptores</i>	Erro! Indicador não definido.1
2.5 <i>Diversidade de hospedeiros</i>	Erro! Indicador não definido.2
2.9 <i>Metagenômica</i>	3Erro! Indicador não definido.
3 OBJETIVOS	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 <i>Amostragem</i>	39
4.2- <i>Extração mecanizada do material genético total</i>	400
4.3 <i>Transcrição reversa</i>	411
4.4 <i>Protocolo de triagem para coronavírus (CHU et al. 2011)</i>	411
4.5 <i>Sequenciamento pelo método de Sanger</i>	Erro! Indicador não definido.2
4.6 <i>Isolamento em ovos embrionados</i>	433
4.7 <i>Preparação das amostras para sequenciamento na plataforma Ion Torrent 55™ System</i>	444
4.7.1 Filtração e purificação das amostras	44
4.7.2 Extração do RNA	44
4.7.3 Transcrição reversa e síntese da segunda fita	455
4.7.4 Quantificação do DNA	445
4.7.5 Preparo da Biblioteca	45
4.7.5.1 <i>Fragmentação do DNA</i>	455
4.7.5.2 <i>Ligação dos adaptadores</i>	456
4.7.5.3 <i>Seleção dos fragmentos por tamanho</i>	456
4.7.5.4 <i>Amplificação fragmentos</i>	456

<i>4.7.5.5 PCR em emulsão e Sequenciamento</i>	4547
4.7.6 Leitura dos dados	47
<i>4.7.6.1 Análise da qualidade dos dados e trimmagem das sequências de adaptadores</i>	47
<i>4.7.6.2 Análise individual das leituras e montagem com genoma de referência</i>	47
<i>4.7.6.3 Análise filogenética</i>	48
5 RESULTADOS	48
<i>5.1 Resultados do isolamento em ovos embrionados</i>	48
<i>5.2- Triagem de amostras coletadas neste estudo</i>	49
<i>5.3 Quantificação de DNA</i>	533
5.3.1 Relatório de qualidade da corrida na plataforma Ion S5™ System	533
<i>5.4 Análise inicial das leituras</i>	544
5.4.1 Montagem dos genomas	555
<i>5.5 Análise filogenética das sequências do gene N e Região Não Codificadora Terminal (3'UTR)</i>	566
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	633
REFERÊNCIAS	634

1 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. Represamentos 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 Fabrício, 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.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Rotas Migratórias

Todos os anos, bilhões de aves deixam suas áreas de reprodução quando as condições se apresentam desfavoráveis, em busca de locais que propiciem maior disponibilidade de alimento e habitat onde possam realizar a manutenção de processos biológicos, para depois retornarem às suas áreas de origem em rotas naturais de migração que superam o sistema geopolítico, ultrapassando as fronteiras entre países e continentes (JAHN et al., 2013).

Para a melhor compreensão dos padrões de rotas migratórias, criou-se o conceito de “flyways”, regiões geográficas onde uma determinada espécie (ou um grupo delas) completa todas as etapas de seu ciclo anual (reprodução, muda, pontos de parada, pontos de invernada, etc.) (CMS, 2014). Nas Américas, quatro “flyways” são reconhecidas: Atlântica, do Mississippi,

Atlântica Central e do Pacífico, todas chegando ao território brasileiro (ICMBio, 2014) (Figura 1).



Figura 1 Rotas migratórias nas américas. Em verde- Rota Atlântica; em roxo- Rota do Mississippi, em amarelo- Rota Atlântica; em azul- Rota do Pacífico (Fonte: [http:// www.lakeregionaudubon.org](http://www.lakeregionaudubon.org)).

Quando chegam ao Brasil, essas rotas se subdividem e são renomeadas formando as 5 grandes rotas brasileiras (Figura 2) (ICMBio, 2016):

- **Rota Atlântica:** percorre toda costa brasileira, do Amapá até o Rio Grande do Sul;
- **Rota Nordeste:** tem início na Baía de São Marcos (MA) e no Delta do Parnaíba e segue pelo interior do Nordeste até a costa da Bahia;
- **Rota do Brasil Central:** divisão da Rota Atlântica na altura da foz do Rio Amazonas e Arquipélago de Marajó, percorrendo os Rios Tocantins e Araguaia, passando pelo Brasil Central e atingindo o Vale do Rio Paraná na altura de São Paulo;
- **Rota Amazônia Central/Pantanal:** rios Negro, Branco e Trombetas passando pela região de Manaus e Santarém, seguindo respectivamente pelo vale dos Rios Madeira e Tapajós, até o Pantanal;
- **Rota Amazônia Ocidental ou Cisandina:** adentra o país pelos vales dos Rios Japurá, Içá, Purus, Juruá e Guaporé, passando pelo Pantanal.

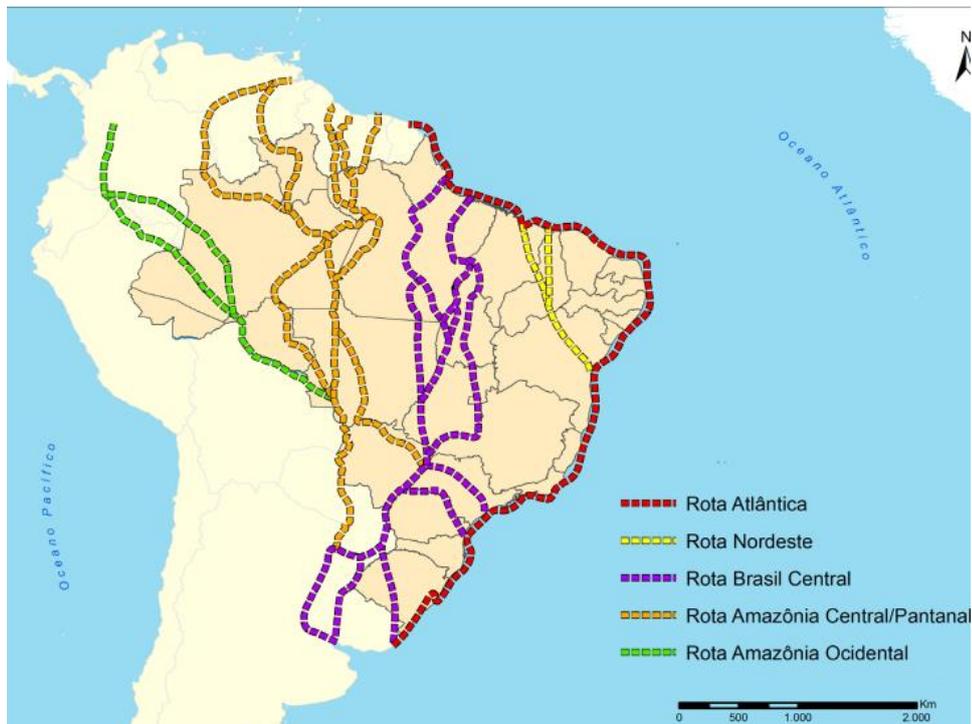


Figura 2 Principais Rotas migratórias no Brasil. Rota Atlântica representada em vermelho; a Rota Nordeste, em amarelo; a Rota do Brasil Central (ou dos Rios Xingu e Tocantins), em roxo; a Rota Amazônia Central/Pantanal (ou Cisplatina), em laranja e a Rota da Amazônia Ocidental, em verde. (ICMBio, 2016).

As aves que chegam ao país são provenientes da América do Norte e Groenlândia (migrantes boreais), ou em áreas no sul da América do Sul e Antártida (migrantes austrais) (LANE et al., 2011) entretanto, de modo geral, as espécies da ordem *Charadriiformes* tem suas rotas migratórias na região costeira do país das quais temos maior volume de informações. Esses animais reproduzem-se no ártico e, com a proximidade do outono boreal, cerca de trinta espécies migram para a América do Sul, chegando à costa brasileira, concentrando-se em um pequeno número de locais onde permanecem de setembro a maio (ARAÚJO et al., 2018). Do ponto de vista das doenças infecciosas, essas áreas são muito importantes pois são locais de aglomeração de diversas espécies (aviárias ou não), provenientes de diferentes localidades (NEWTON, 2007).

2.2. Vírus Aviários

Devido ao seu comportamento de bandos e habilidade de voar longas distâncias, as aves são reservatório de um grande número de vírus emergentes e podem potencialmente disseminá-los de forma eficiente para outras espécies, aviárias ou não, e seres humanos (MILEK et al.,

2018). Aqui vamos citar alguns dos mais frequentes, entre eles os flavivírus, influenza e rotavírus.

Os membros da família *Flaviviridae* que incluem os vírus da Encefalite de Saint Louis (SLEV), Vírus da Encefalite Japonesa, Vírus Iguape, Rocio, em especial, o Vírus da Encefalite do Oeste do Nilo (WNV). Estes Flavivírus têm aves silvestres como amplificadoras e os seres humanos como hospedeiros acidentais, sendo principalmente transmitidos por mosquitos ornitofílicos, destacando-se o gênero *Culex* (MICHEL et al., 2018).

O WNV foi primeiramente isolado na província de West Nile, Uganda, em 1937 (SMITHBURN et al., 1953). Sua patogenicidade foi considerada leve a moderada até que, em 1999, o vírus causou um grande surto em Nova York, nos EUA, levando à morte um grande número de aves e foi relacionado a casos humanos de encefalite fatal (EYEPOOSH et al., 2019). No Brasil, anticorpos contra WNV foram detectados pela primeira vez no ano de 2010, em amostras provenientes de aves migratórias e o isolamento foi realizado em 2019 em amostras de sistema nervoso central de um cavalo (LOPES et al., 2014).

Além dos vírus de potencial zoonótico, entre os Flavivírus há também aqueles que, apesar de nunca terem sido relatados como causadores de doenças humanas, infectam aves domésticas e podem levar a perdas econômicas (LEI et al., 2017). O Tembusu, um vírus descoberto inicialmente do mosquito *Culex tritaeniorhynchus* na Malásia em 1955 e vem causando importantes perdas econômicas na China, em especial nas criações de patos, desde sua introdução naquele país, no ano de 2010, até os dias de hoje (YU et al., 2018). Em aves, este vírus causa grande inflamação ovariana, levando à queda de postura. A infecção por este patógeno foi já relatada em gansos (HUANG et al., 2013), galinhas (LIU et al., 2012) mosquitos (TANG et al., 2018), pardais (TANG et al., 2015), pombos (LIU et al., 2012) e ratos (LI et al., 2013). Além disso, ainda que não tenham sido relatados casos de doença em seres humanos, anticorpos contra Tembusu foram detectados no soro de 71,9% (n=95/132) dos trabalhadores da indústria de patos analisados no estudo de (TANG et al., 2015). Estes resultados indicam que o vírus está expandindo sua gama de hospedeiros, e pode representar uma ameaça inclusive à saúde pública.

Outro vírus importante vírus é o Influenza, um membro da família *Orthomyxoviridae*. Aves aquáticas como gaivotas, patos e maçaricos são hospedeiros naturais dos vírus influenza do tipo A (IVA), que podem ser classificados, com base na sua virulência e apresentação clínica em aves, em altamente patogênicos e de baixa patogenicidade (VENKATESH et al., 2018).

Apesar da maioria das estirpes do IVA não representarem um risco para a saúde humana, algumas estirpes como o H7N9 e o H5N1, cruzaram a barreira das espécies e resultaram em infecções humanas (LYCETT et al., 2019).

O genoma segmentado destes vírus permite eventos de recombinação quando diferentes linhagens infectam o mesmo hospedeiro (VENKATESH et al., 2018). Estirpes recombinantes foram identificadas na maioria dos casos de pandemias e em diversos surtos de aves domésticas (NGA et al., 2019).

Ainda entre os agentes virais possivelmente carreados por aves estão os rotavírus. Membros da família Reoviridae, são uma das principais causas de gastroenterite aguda em crianças e em várias espécies de mamíferos e aves, ainda que infecções interespecíficas não sejam frequentes. Em aves, foram detectados os grupos de rotavírus A, D, F e G (McNULTY et al. 1980; McNULT 2008; TROJNAR et al. 2010; JOHNE et al. 2011). Os rotavírus do grupo A (RVA) estão principalmente associados à diarreia em humanos, vários mamíferos e aves (BESERRA et al., 2014).

2.3. *Coronavírus aviários*

Entre os patógenos de grande importância que podem ser dispersos por aves, destacam-se os CoVs, uma família de vírus envelopados com RNA de fita simples (ssRNA) e senso positivo, conhecidos desde meados de 1930 (CAVANAGH, 2007).

O grande marco no estudo desses vírus foi a emergência da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS), em 2002, um vírus que surgiu de morcego, na China, sofreu recombinações, e passou a acometer seres humanos, matando mais de 700 pessoas entre 2002 e 2004 em todo o mundo (CDC, 2004).

Até então, o conhecimento sobre Coronavírus em aves se limitava basicamente a três espécies: galinhas domésticas (*Infectious Bronchitis Virus- IBV*), perus (*Turkey Coronavirus - TCoV*) e faisões (*Pheasants Coronavirus – PhCoV*) todos bastante próximos em sequência e antigenicamente. Após o reconhecimento da capacidade dos CoVs de realizar *shifts*, iniciou-se uma corrida para identificar novos CoVs animais e, assim, diversas novas espécies ficaram conhecidas (WOO et al., 2012).

O IBV é, por definição, um CoV de aves domésticas, causador de uma das doenças aviárias que mais causam perdas econômicas em todo o mundo (FELLAHI et al., 2015). Todas as galinhas são susceptíveis à infecção pelo IBV, e os sinais respiratórios incluem dispneia, tosse, estertores e secreção nasal. As aves geralmente ficam prostradas e empoleiradas. Outros

sinais incluem fezes amolecidas e aumento no consumo de água. A estirpe do vírus determina a patogênese da doença, ou seja, o grau e a duração das lesões em diferentes órgãos. O trato respiratório superior é o local primário da infecção, mas o vírus também pode se replicar nos sistemas reprodutivo, renal e digestivo (BANDE et al., 2016).

O controle da doença é baseado principalmente na vacinação, mas o vírus sofre mudanças antigênicas constantes que, por vezes, pode resultar em uma proteção incompleta (CAVANAGH, 2007).

Embora as galinhas sejam o hospedeiro primário dos IBVs, diversos estudos identificaram vírus similares ao IBV (IBV-like) em patos, gansos e pombas. Como há poucas sequências completas disponíveis desses vírus semelhantes ao IBV em espécies de aves diferentes de galinhas, a taxonomia exata desses vírus IBV-like é constantemente alterada (CHEN et al., 2013; ZHUANG et al., 2015).

Na China, em 2013 foi reportado um novo *Gammacoronavírus* similar ao IBV circulando em patos. Esse novo vírus, apesar de bastante próximo do circulante em galinhas, parece ser dominante entre patos silvestres e domésticos no país e não foi possível o isolamento quando inoculado em ovos embrionados de galinha (ZHUANG et al., 2015).

Em 2014, um novo *Gamacoronavírus* similar ao TCoV foi detectado como causador de uma doença fulminante em galinha d'angola (*Numida meleagris*) na França. Essa doença, também chamada doença X, é relatada há décadas no país e é caracterizada por enterite aguda, prostração intensa e uma taxa de mortalidade bastante alta, chegando a dizimar criações inteiras (LIAIS et al., 2014). Ainda em 2014, um novo *Deltacoronavírus* foi detectado através de metagenômica na Baía de Delaware, nos Estados Unidos, em um Vira-Pedras (*Arenaria interpres*) (HONKAVUORI et al., 2014).

Outros estudos também sugerem que há uma diversidade de coronavírus que circulam em aves silvestres, como no estudo realizado por CHU et al. (2011) em Hong Kong entre novembro de 2009 e janeiro de 2010, que coletaram e analisaram 658 amostras de fezes frescas de aves dos pântanos de Mai Po. Noventa e nove (15,0%) destas amostras foram positivas por RT-PCR para CoVs. No Camboja, swabs cloacais foram coletados de 263 aves silvestres e resultados positivos pela mesma técnica foram obtidos em 13,0% dos animais testados (CHEUNG et al., 2009). Em 2010, MURADRASOLI et al. (2010) detectaram a presença de *Gammacoronavírus* em 64 aves silvestres na região da Beríngia (entre a Sibéria e o Alasca). Nestes estudos, todos os Coronavírus identificados pertenciam aos grupos *Gamma* e *Deltacoronavírus*.

Em estudo com aves aquáticas australianas foram encontrados, em animais da ordem dos *Charadriiformes*, *Gammacoronavirus* muito mais correlacionados com CoVs de pato do que aos tipicamente encontrados nesta ordem. No mesmo estudo, foram encontrados *Deltacoronavirus* em patos e garças com cerca de 20% de diferença quando comparado às sequências de CoVs já conhecidos (CHAMINGS, 2018).

No Brasil, estudos sobre a presença de CoVs em aves silvestres ainda são bastante escassos. Em um dos estudos realizados, foram coletadas amostras de 25 diferentes espécies de aves no zoológico de Bauru das quais 8 amostras foram positivas para *Gammacoronavirus* sendo duas pertencentes a *Galliformes*, duas a *Ciconiiformes*, uma *Gruiforme* e uma *Sphenisciforme* (CARDOSO et al., 2011). Em um segundo estudo, aves de um Centro de Triagem de Animais Silvestres de Campinas (São Paulo, Brasil) foram positivas para *Deltacoronavirus* e um ainda não reconhecido *Betacoronavirus* (DURÃES-CARVALHO et al., 2015). Mais recentemente em 2019 um estudo realizado pelo nosso grupo mostrou a circulação de CoVs em aves silvestres e domésticas relacionadas a rota migratória Atlântica (BARBOSA et al., 2019).

Esses dados evidenciam que os coronavírus aviários possuem uma distribuição mais ampla e maior número de hospedeiros do que se pensava anteriormente e sugerem que as aves selvagens desempenham um papel fundamental na epidemiologia dos CoVs.

2.4. Taxonomia

Os CoVs são o maior grupo de vírus descritos dentro da ordem dos *Nidovirales*, a qual pertencem as subordens *Abnidovirinae*, *Arnidovirinae*, *Cornidovirineae*, *Mesnidovirineae*, *Monidovirinae*, *Ronidovirineae* e *Tornidovirineae*. Dentro da subordem *Cornidovirineae*, há a família *Coronaviridae* que, por sua vez, é dividida em duas subfamílias, *Letovirinae* (que compreende vírus de anfíbios) e *Orthocoronavirinae* com os vírus de animais de sangue quente (ICTV, 2019).

Atualmente a classificação da subfamília *Orthocoronavirinae* é dividida nos gêneros *Alfa*, *Beta*, *Gama* e *Delta* coronavírus (Figura 3).

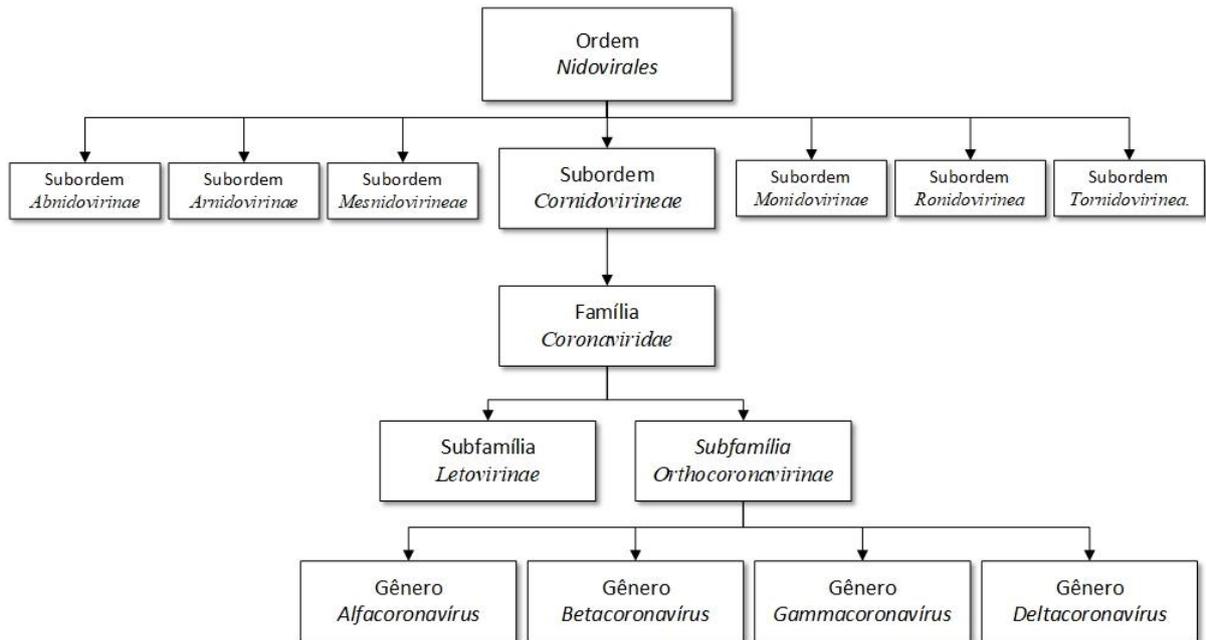


Figura 3 Representação esquemática da taxonomia dos CoVs de acordo com o ICTV (Fonte: ICTV, 2019).

Os gêneros que reconhecidamente afetam aves são os *Gammacoronavírus* e os *Deltacoronavírus*. O primeiro, é subdividido em dois subgêneros: *Cegacovírus*, que compreende um vírus de Baleias Beluga, e *Igacovírus*, englobando todos os *Gammacoronavírus* aviários, semelhantes ou não ao IBV. Os *Deltacoronavírus*, por sua vez, subdividem-se em quatro subgêneros: *Andecovírus*, *Moordecovírus* e *Herdecovírus* exclusivos de espécies que afetam aves e *Buldecovírus*, ao qual estão inclusos vírus aviários, suínos e murinos (ICTV, 2019).

2.5 Estrutura do Virion

Os CoVs são vírus bastante pleomórficos, com diâmetro entre 120 e 160nm, conforme mostrado em estudos por microscopia eletrônica (Figura 4) com presença de envelope, que é constituído por dupla camada de lipídeos e proteínas estruturais. A superfície do virion, repleta de projeções, causam a aparência semelhante a uma coroa que dá nome ao vírus (*corona*, derivado do grego κορώνη, significando coroa) (WOO et al., 2010).

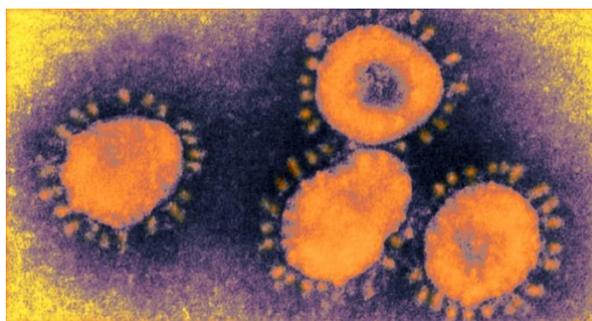


Figura 4 Microscopia eletrônica colorida de um Coronavírus humano 229E (Fonte: Micrografia de F. A. Murphy, University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, <disponível em: <https://www.utmb.edu/virusimages/>>, acesso em: 09/09/2019).

Os CoVs possuem capsídeo helicoidal simétrico formado pela proteína de nucleocapsídeo (N), envolvida por um envelope lipídico no qual a glicoproteína de membrana (M) e outras pequenas proteínas transmembrânicas (E) estão embebidas. As glicoproteínas Spike (S) se ancoram no envelope lipídico e se estendem radialmente, formando espículas de aproximadamente 20nm de comprimento (WOO et al., 2010; FEHR & PERLMAN, 2016). Alguns CoVs apresentam ainda uma proteína extra, a hemaglutinina esterase (HE), presente no envelope viral (HURST et al., 2010). Conforme esquematizado na figura 5, estas são as quatro principais proteínas estruturais dos CoVs, que serão melhor descritas a seguir.

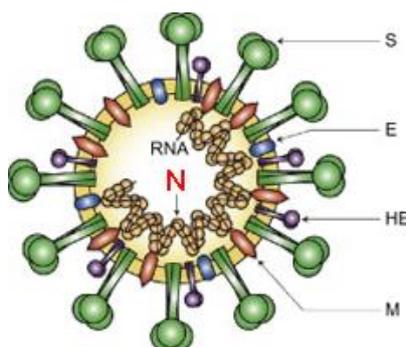


Figura 5 Esquematização da estrutura de um Coronavírus. N- Proteína de Nucleocapsídeo, M- Proteína de Membrana, HE- Hemaglutinina Esterase, E Proteína de Envelope (Modificado de: ESCORS et al., 2001).

2.5.1 Proteína de nucleocapsídeo (N)

O nucleocapsídeo é uma ribonucleoproteína helicoidal longa e flexível constituído de uma única fosfoproteína, a proteína N. Ela é composta de dois domínios separados: um domínio N-terminal (NTD) e um domínio C-terminal (CTD) (Figura 6). In vitro, ambos os domínios são capazes de ligar-se ao RNA mas cada um deles se utiliza de um mecanismo diferente para realizar essa ligação, sugerindo que para uma ligação ideal ao RNA, são necessárias contribuições dos dois domínios (HURST et al., 2010; FEHR; PERLMAN, 2016).

Com massa variando entre 45 e 60kDa, a proteína N é sintetizada em grandes quantidades durante a infecção, sendo capaz de se ligar ao ssRNA de forma inespecífica mas demonstrando uma crescente afinidade pelo genoma viral. A interação entre a proteína N e o RNA é mediada por sinais de contidos nas sequências *leader*. Durante o ciclo viral, diversas cópias da proteína N interagem com o RNA genômico e RNAs subgenômicos, indicando que há um papel dessa proteína na transcrição e tradução (MCBRIDE; VAN ZYL & FIELDING, 2014).

Os CoVs adquirem seu envelope lipídico durante o brotamento do nucleocapsídeo através das membranas do retículo endoplasmático, associando-se às proteínas do envelope, em especial à proteína M. É esta associação que leva à incorporação do nucleocapsídeo em vírus envelopados (NARAYANAN et al., 2000). Múltiplas cópias da fosfoproteína N interagem intimamente com as moléculas de RNA genômico e subgenômico participando, juntamente com a proteína M, da condensação do genoma e empacotamento (JAYARAM et al., 2006).

Além do seu papel estrutural, a proteína N também demonstrou estar ligada a outros processos durante a infecção, incluindo a transcrição de mRNA, replicação e modulação da célula hospedeira (CHAN et al., 2013).

Por ser bastante imunogênica, essa proteína ainda tem importância como um marcador para diagnóstico, sendo um alvo comum para clonagem e geração de proteínas recombinantes. LU et al. (2011) demonstrou que, no CoV causador da SARS (SARS-CoV), a proteína N pode controlar o ciclo celular da célula hospedeira mantendo-a em fase S através da regulação da atividade da CDK-ciclina e ainda suprimir a transcrição de fatores celulares de resposta ao estresse, além de ter atividade antagonista aos interferons β .

Os CoVs podem também interferir na transdução de sinais celulares através da fosforilação da proteína N em um estágio tardio da infecção, o que pode contribuir no mecanismo de evasão do sistema imunológico do hospedeiro (KOPECKY-BROMBERG et al., 2007; MCBRIDE, VAN ZYL & FIELDING, 2014).

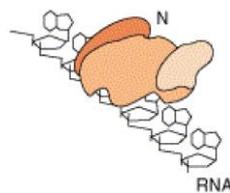


Figura 6 Esquematização da Proteína de nucleocapsídeo (N) de um CoV (GÓES, 2012).

2.5.2 Proteína de Membrana (M) e de Envelope (E)

As proteínas E e M são pequenas proteínas transmembrânicas que, em conjunto com a proteína S, formam o envelope dos CoVs. Apesar de serem bastante conservadas em todos os CoVs suas sequências são excessivamente curtas para torná-las alvos de estudos filogenéticos (CHAN et al., 2013).

Quando expressas em conjunto, essas proteínas formam partículas semelhantes aos virions em tamanho e formato, demonstrando que as proteínas M e E são requisitos mínimos para a formação do envelope (NARAYANAN et al., 2000)

A proteína M é a mais abundante proteína estrutural no virion e, ao que tudo indica, dá ao vírus seu formato arredondado. Com 25 a 30 kDa, é bastante pequena e possui 3 domínios transmembrânicos. Possui um pequeno ectodomínio glicosilado N-terminal e um endodomínio C-terminal muito maior (Figura 7), que se estende 6 a 8 nm dentro da partícula viral. Suas principais funções são dar forma à partícula viral e sua ligação à proteína N, conectando-se ao nucleocapsídeo (FEHR; PERLMAN, 2016).

KUO et al (2016) demonstrou que a proteína M tem papel central na morfogênese do virion, organizando os componentes da membrana viral através de interações entre proteínas M e com a proteína N, que leva ao processo de montagem do virion em si.

Sabe-se ainda que, no CoV causador da SARS, a proteína M é capaz de suprimir a produção de interferons do tipo I. Essa supressão da resposta antiviral inata representa uma medida contra a imunidade inata do hospedeiro, o que poderia ter papel significativo na patogênese da SARS (SIU et al., 2014).

Encontrada em pequenas quantidades no virion, a proteína E, por sua vez, possui tamanho pequeno, variando entre 8 e 12 Kda, sendo bastante divergente entre os CoVs, mas possuindo uma estrutura comum: um ectodomínio N-terminal e um endodomínio C-terminal (Figura 6), com atividade como canal de íons. Ao contrário das demais proteínas estruturais, alguns CoVs podem sobreviver sem a presença desta proteína. (WOO et al., 2010).

A proteína E facilita ainda a montagem e liberação das partículas virais e, apesar de sua função como canal de íons não ser essencial na replicação viral, mostrou-se bastante importante na patogenicidade de vírus da SARS (KUO et al., 2016). Além de ser capaz de induzir apoptose em células infectadas com o Vírus da Hepatite Murina (MHV) (MAEDA et al., 2001).

Essas glicoproteínas interagem ainda com as fosfoproteínas N, participando do processo de empacotamento do RNA, e forma um complexo com as proteínas S e HE, podendo estar

associada a determinação do sítio intracelular de ligação do vírus ao complexo de Golgi (SATIJA & LAL, 2007).

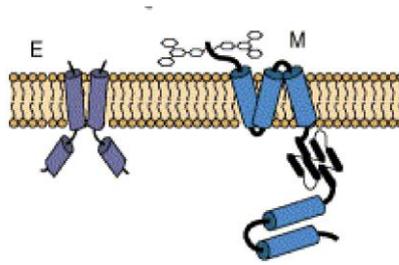


Figura 7 Esquematização das Proteínas Envelope (E) e de Membrana (M) de um Coronavírus (GÓES, 2012).

2.5.3 Proteína de espícula (S)

A proteína S é uma grande proteína trimérica, transmembrânica com 180 a 200 kDa de massa, com um domínio N-terminal, possuindo de 21 a 35 sítios de glicosilação, responsável pela ligação ao receptor hospedeiro, e um domínio C-terminal, responsável pela fusão à célula hospedeira. A proteína S (figura 8) é considerada uma proteína de fusão de classe I e, na maioria dos CoVs é dividida em duas subunidades: S1 e S2 (KUO et al., 2016).

A subunidade S1 divide-se em 2 subdomínios, HR1 e HR2, sendo que ambos funcionam como domínios de ligação ao receptor (RBDs) e se ligam a uma grande variedade de proteínas e açúcares. Trata-se do sítio de maior divergência entre os CoVs, enquanto a subunidade S2, mais conservada, carrega a maquinaria responsável pela fusão à célula hospedeira (BELOUZARD et al., 2012).

O domínio N-terminal de alguns coronavírus pode ligar-se a porções de carboidratos como o ácido neuramínico 9-O-acetilado (coronavírus bovino, BCoV e coronavírus humano HCoV-OC43), enquanto o domínio C-terminal se liga a receptores proteicos (HEALD-SARGENT & GALLAGHER, 2012).

Outra importante função da proteína S está relacionada à fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira. Vírus envelopados podem entrar diretamente na célula após a ligação ao receptor ou através de endocitose, onde a fusão se dá com a membrana endossomal. Nos dois casos essa fusão se dá através de grandes mudanças conformacionais da proteína S causadas por diferentes e complexos mecanismos como acidificação do pH e ativação proteolítica (BELOUZARD et al., 2012)

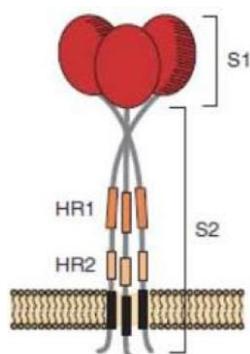


Figura 8 Esquemática da Proteína Spike (S) de um coronavírus, com suas subunidades (S1 e S2) e subdomínios de S2 HR1 e HR2(GÓES, 2012).

Devido a semelhanças estruturais entre os domínios N-terminais de CoVs e proteínas de células hospedeiras, tem sido sugerido que o domínio N-terminal surgiu a partir de um domínio galactina-like hospedeiro incorporado por um CoV ancestral (PENG et al., 2011).

O domínio N-terminal é dispensável em alguns CoVs como o HCoV 229E. No CoV Respiratório Porcino (PRCoV), uma outra variante natural do vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEV) parece ter tido o domínio N-terminal deletado da proteína *Spike* levando a um *shift* no tropismo celular da forma entérica (TGEV) para a forma respiratória (PRCoV). Dependendo da espécie de CoV, o domínio de ligação ao receptor (RBD) pode ser encontrado no domínio N-terminal, no domínio C-terminal ou ambos (GRAHAM & BARIC, 2010).

O pareamento da proteína S pelo receptor na superfície celular é, portanto, o que determina o tropismo do vírus pela célula. Para infectar novos tecidos em um mesmo hospedeiro ou até mesmo diferentes espécies, os CoVs devem se adaptar ao receptor do novo hospedeiro através de mutação ou recombinação com outro coronavírus que já seja capaz de infectar essa nova espécie (WU et al., 2012).

2.5.4 Hemaglutinina esterase (HE)

Alguns *Betacoronavírus* apresentam ainda a hemaglutinina esterase (HE) em seus envelopes. Apesar de aparentemente não essencial, essa proteína pode atuar na adsorção, inserção e liberação dos vírus aumentando a virulência (SATIJA et al., 2007).

2.6 Genoma

Conforme mostrado na figura 9, após a ORF1, há uma série de ORFs que variam de acordo com o vírus. A montante de cada ORF encontra-se sempre uma pequena sequência repetitiva chamada TRS (UJIKE et al., 2014) .

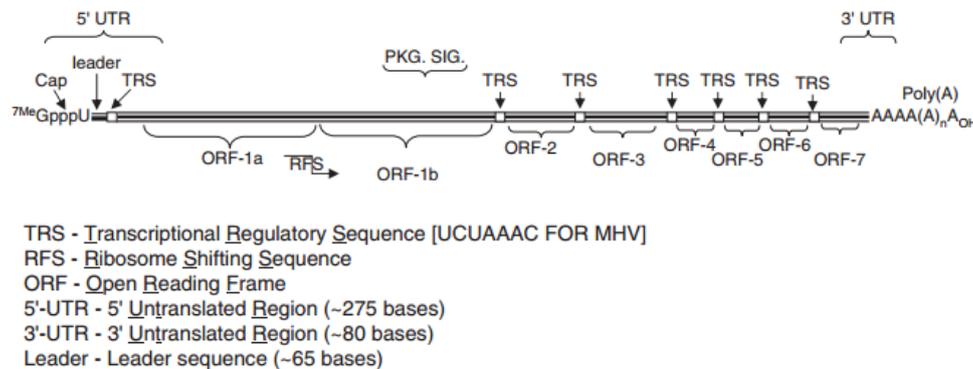


Figura 9 Estrutura do genoma dos coronavírus (Fonte: UJIKE et al., 2014).

A porção 5' do genoma viral contém o gene da replicase, que codifica diversas atividades enzimáticas. Esse gene é codificado em dois grandes ORFs, ORF 1a e 1b, que são traduzidos em dois grandes peptídeos, ppl1a e ppl1b, através de um mecanismo de *frameshifting* que envolve um pseudo-nó formado no RNA genômico (figura 10) (HAGEMEIJER et al., 2012)

Esse mecanismo de *frameshift* é importante pois permite a criação de diversas proteínas de um genoma relativamente pequeno. Enquanto o ribossomo traduz o mRNA ele pode deslocar para frente ou para trás. Uma vez que cada códon é criado por 3 aminoácidos consecutivos, esse deslocamento leva a um novo *frame* de leitura com sequências de aminoácidos diferentes e, portanto, uma proteína diferente (SATIJA et al., 2007).

As proteínas estruturais ficam codificadas no terceiro terço do genoma, na ordem S-E-M-N em todos os CoVs (nos que expressam a proteína HE, ela permanece codificada na posição 5' à proteína S) (UJIKE et al., 2014) (Figura 10).

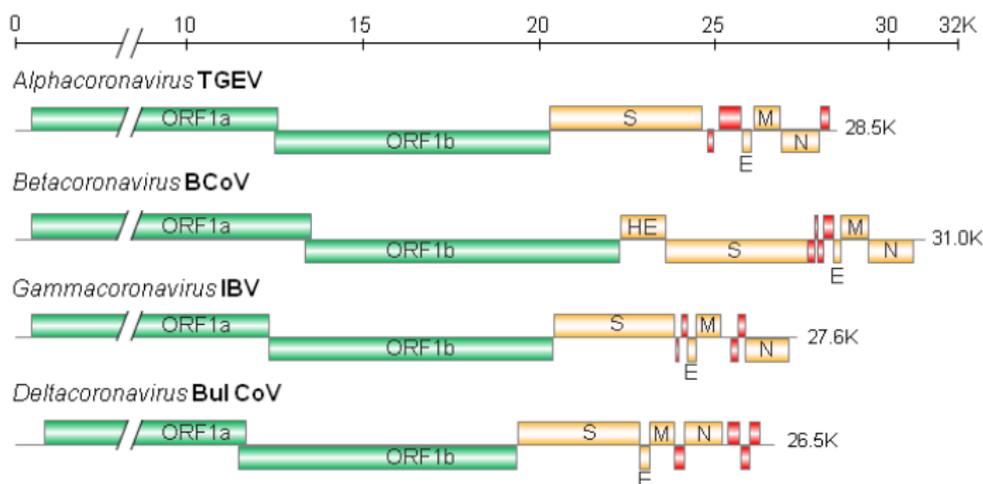


Figura 10 Organização genômica de vários gêneros CoVs. Os dois primeiros terços do o genoma contém os *Open Reading Frames* (ORF) 1a e 1b, que codificam as proteínas replicase / transcriptase (verde). O terço restante do genoma codifica quatro proteínas estruturais: proteínas *Spike* (S), Envelope (E), Membrana (M) e Nucleocápside (N) (Laranja). Alguns *Betacoronavirus* apresentam um gene adicional, a Hemaglutinina-Esterase (HE) (Laranja). O genoma de cada gênero ou espécie possui um conjunto de proteínas acessórias exclusivas (vermelho) (Fonte: UJIKE et al., 2014).

2.7 Ciclo de Replicação

A ligação inicial do virion à célula hospedeira é iniciada com as interações entre a proteína S e seu receptor. O vírus ganha acesso ao citosol através da clivagem proteolítica ácido-dependente da proteína S, seguida pela fusão das membranas viral e celular. Essa clivagem da proteína S ocorre em dois sítios da região S2 da proteína: a primeira separa a os domínios RBD e de fusão da proteína S e o segundo expõe o peptídeo de fusão (HEALD-SARGENT & GALLAGHER, 2012).

A fusão, em geral, ocorre em endossomos acidificados, mas em alguns CoVs (como o MHV) pode ocorrer na membrana plasmática. O peptídeo de fusão exposto, se insere na membrana e é seguido pela junção de duas repetições de S2, formando um feixe de seis hélices antiparalelas. A formação deste feixe permite a liberação do genoma viral no citoplasma (SATIJA et al., 2007).

Uma vez no citoplasma, inicia-se a tradução do gene da replicase, a partir do genoma de RNA do virion. O genoma viral atua como mRNA e as regiões ORF 1a e 1b são diretamente traduzidas pelos ribossomos gerando as poliproteínas pp1a e pp1ab (figura 11). Para gerar as duas proteínas a partir de um mesmo ORF, o vírus se utiliza de uma sequência “escorregadia”

(5'-UUUAAAC-3') e um pseudo-nó que causa o *frameshifting* ribossomal do *frame* do ORF repla para o *frame* rep1b (KURO et al., 2016).

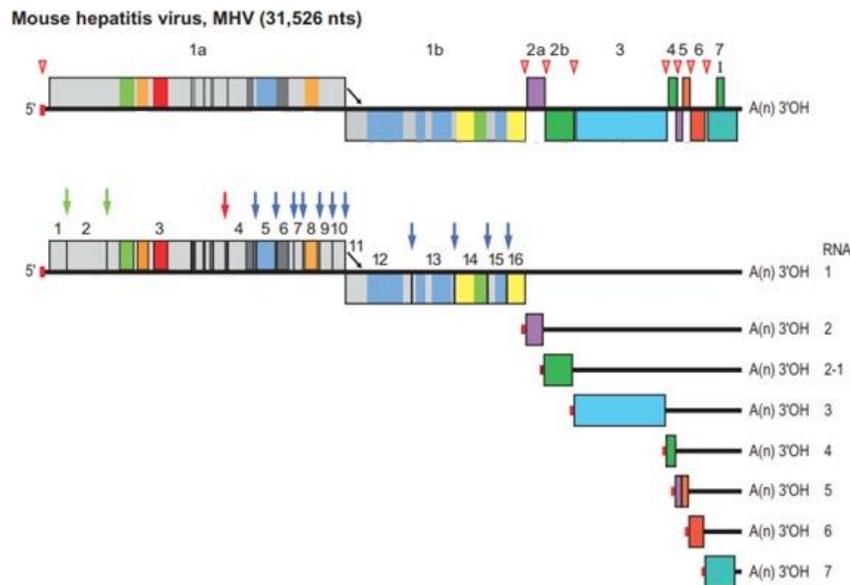


Figura 11 Representação esquemática do genoma do Vírus da Hepatite Murina (MHV) mostrado como exemplo. As ORFs são representadas por caixas, indicadas pelo número (acima) e pela proteína codificada (siglas abaixo). As regiões que codificam os principais domínios nas poliproteínas de replicase pp1a e pp1ab são mostradas em cinza escuro. A sequência de líder 5' é representada por uma pequena caixa vermelha. A seta entre a ORF 1a e 1b representa o sítio de *frameshifting* ribossomal. A cauda poli (A) é indicada por "A (n)". Setas vermelhas indicam as localizações das sequências reguladoras da transcrição (TRSs). No panel inferior, há o processamento das poliproteínas replicase e relação estrutural entre o RNA genômico e os mRNAs subgenômicos. As setas indicam locais de clivagem da PL1pro (verde), PL2pro (vermelho) e Mpro (azul). As localizações das proteínas não estruturais (nsp's) são indicadas pelo seu número (Fonte: PLANT & DINMAN, 2008).

Na maioria dos casos, o ribossomo desenrola a estrutura do pseudo-nó, e continua a tradução até encontrar o códon de parada. Ocasionalmente, o pseudo-nó bloqueia a tradução no ribossomo, fazendo-o pausar na sequência "escorregadia", fazendo o *frame* de leitura retroceder um nucleotídeo, no chamado -1 *framehift*, resultando na tradução de pp1ab (PLANT & DINMAN, 2008).

As poliproteínas pp1a e pp1ab contêm as proteínas não estruturais (nsps) 1-11 e 1-16, respectivamente (com exceção dos gammacoronavírus que contêm uma nsp1 a menos). Estas poliproteínas são subsequentemente clivadas nos nsps individuais por duas ou três proteases que clivam as poliproteínas de replicação. São as proteases tipo papaína (PLpro), uma protease de tipo serina e a protease principal, ou Mpro (FEHR & PERLMAN, 2016).

Em resumo, essas poliproteínas são então lisadas levando à formação de 15 proteínas não-estruturais no AvCoV (CAVANAGH, 2007) ou 16 nos demais coronavírus, todas

necessárias à replicação e transcrição, que se arranjam em vesículas de membrana dupla, dentro das quais a síntese de RNA genômico e subgenômico ocorre (DE GROOT et al., 2013).

Em seguida, muitas das nsps se reúnem no complexo replicase-transcriptase (RTC) para criar um ambiente adequado para a síntese de RNA e, finalmente, realizar a replicação e transcrição do RNA sub-genômico. Um exemplo dessas nsps é a nsp12, que codifica a enzima RNA-Polimerase-RNA-dependente (RpRd) (KUO et al., 2016).

Após a tradução e montagem dos complexos de replicase viral inicia-se a síntese de RNA viral produz RNAs genômicos e sub-genômicos, ambos de cadeia negativa. Os RNAs genômicos servem como mRNAs para os genes estruturais e acessórios a jusante das proteínas de replicação (BELOUZARD et al., 2012).

Muitas sequências de ação cis são importantes para a replicação desses RNAs virais. Dentro da região 5'UTR do genoma há sete estruturas *steam-loop*. A região 3'UTR contém *steam-loops*, um pseudo-nó e uma região hipervariável. Acredita-se que essas estruturas tenham o propósito de regular a síntese de RNA, embora exatamente quais estágios são regulados e seu mecanismo de ação preciso ainda são desconhecidos (FEHR & PERLMAN, 2016).

A maior peculiaridade a respeito da replicação dos CoVs está na forma como os seguimentos TRS da sequência *leader* e os que precedem os genes ao longo do genoma se fundem durante a produção de RNAs sub-genômicos. Originalmente, pensou-se que o processo ocorreria durante a síntese de cadeia positiva, mas agora é acredita-se ocorrer ainda durante a extensão descontínua de cadeia negativa RNA. Essa habilidade de mudança de posição na fita de RNA da RpRd dos CoVs leva à uma elevada capacidade de recombinação homóloga e não-homóloga, podendo predispor essa subfamília a eventos de *shift* e *drift* gênicos (BELOUZARD et al., 2012).

A montagem do virion ocorre no interior de vesículas, que se fundem a membrana plasmática, liberando novos vírus. Diferentemente de outros vírus de RNA, a replicação dos CoVs ocorre quase inteiramente no citoplasma da célula infectada (figura 12). Após a replicação e síntese de RNAs sub-genômicos, as proteínas estruturais virais, S, E e M são traduzidas e inseridas no retículo endoplasmático (ER) onde os genomas virais recebem os capsídeos por ligação à proteína N e emergem pelas membranas do ER contendo proteínas estruturais virais, formando virions maduros (BERGMANN, LANE & STOHLMAN, 2006).

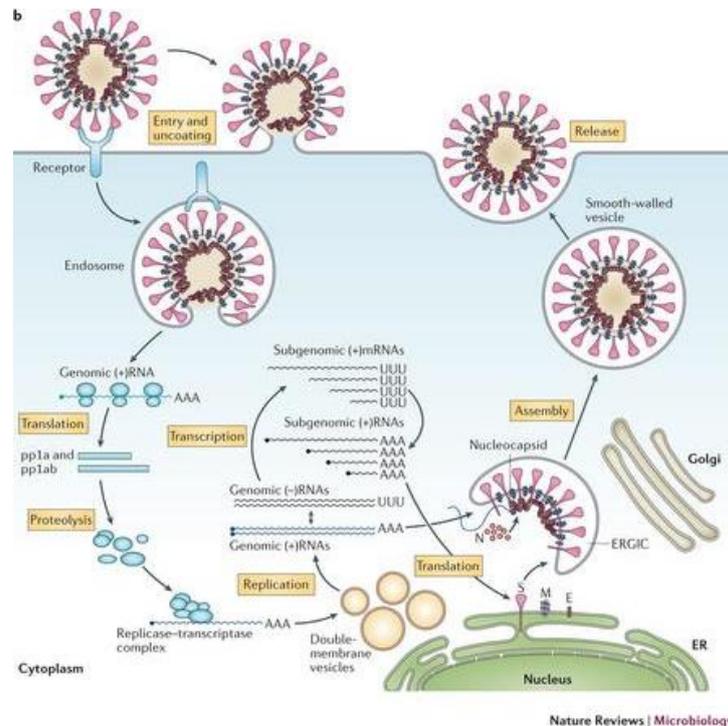


Figura 12 Ciclo celular dos coronavírus causadores da SARS e da MERS (FEHR; PERLMAN, 2016).

Após a montagem, os virions são transportados para a superfície celular em vesículas e liberados por exocitose. Não se sabe se os virions usam a via tradicional para o transporte de grandes cargas do Retículo de Golgi ou se o vírus realiza um caminho único para sua saída (FEHR & PERLMAN, 2016).

Em vários coronavírus, a proteína S só se acopla ao virion na superfície celular, onde faz a mediação entre a célula infectada e células adjacentes não infectadas. Esse processo leva à formação de células gigante multinucleadas, que permite ao vírus espalhar a infecção sem ser detectado pelo sistema imunológico (HEALD-SARGENT & GALLAGHER, 2012).

2.8 Receptores

O reconhecimento de receptores por vírus é o primeiro e essencial passo de infecções virais de células hospedeiras. O ancoramento da proteína S media a entrada na célula hospedeira ligando-se ao receptor na superfície celular e realizando a fusão entre as membranas viral e celular (WU et al., 2012).

Os CoVs reconhecem uma grande variedade de receptores hospedeiros, não necessariamente relacionados com os gêneros em que estão classificados (Tabela 1). Por exemplo, mesmo o HCoV-NL63 pertencendo ao gênero *Alpha* e o SARS-CoV pertencendo ao gênero *Beta*, ambos reconhecem o mesmo receptor, a enzima conversora de angiotensina 2

(ACE 2). Por outro lado, ainda pertençam ao gênero Alpha, HCoV-NL63, TGEV e PRCV reconhecem receptores diferentes: TGEV e PRCV reconhecem a aminopeptidase N (APN). Da mesma forma, SARS-CoV e MERS-CoV, ambos pertencendo ao gênero *Beta*, reconhecem receptores diferentes- MERS-CoV reconhece o receptor Dipeptidyl Peptidase 4 (DPP4) (GRAHAM & BARIC, 2010).

No geral, os CoVs seguem um padrão extremamente complexo de reconhecimento de receptores: CoVs podem utilizar tanto um quanto ambos os domínios de S1 como RBDs; CoVs com S1 bastante similares e do mesmo gênero podem reconhecer receptores diferentes, da mesma forma que CoVs com S1 bastante diferentes e de gêneros diferentes podem reconhecer o mesmo receptor; CoVs podem reconhecer tanto receptores proteicos quanto açúcares (BELOUZARD et al., 2012).

Diversas linhas de pesquisa estabeleceram o reconhecimento de receptores como uma das maiores barreiras interespecíficas. Estudos demonstraram que o SARS-CoV não infecta células de ratos de forma eficiente devido à falta de afinidade com o receptor ACE2 murino. Em contraste, quando as células dos roedores foram induzidas a expressar receptores ACE2 humanos, a infecção ocorreu. Da mesma forma, o SARS-CoV não foi capaz de infectar eficientemente células de morcego. Entretanto, o RBD viral foi substituído por um RBD sintético de vírus de morcegos, a infecção ocorreu (GRAHAM & BARIC, 2010; HEALD-SARGENT & GALLAGHER, 2012).

2.5 Diversidade de Hospedeiros

A inespecificidade da RpRd dos CoVs, sua mudança aleatória de sequência molde e seu grande genoma fazem com que os CoVs possuam não somente uma grande variedade de cepas e genótipos, como também resultam em novas espécies. Assim elas podem ser capazes de se adaptar a novos hospedeiros e nichos ecológicos, inclusive podendo passar a acometer seres humanos. Esta característica da RpRd dos CoVs causa taxas de mutação da ordem de 1 para 1000 a 10000 nucleotídeos replicados, tornando-os bastante maleáveis. A mudança aleatória de sequência-molde durante a replicação do RNA dos CoVs é única e leva a uma frequência de recombinação homóloga bastante alta e, como possuem o maior genoma entre todos os vírus de RNA conhecidos, os CoVs possuem uma plasticidade extra para acomodar e modificar genes (CHAN et al., 2013).

Suspeita-se que os CoVs tenham surgido há mais de 300 milhões de anos, correspondendo no tempo à coevolução e codivergência das espécies de morcegos e aviários (MILEK & BLICHARZ-DOMANSKA, 2018). Sua diversificação subsequente foi um produto de diferenças na ecologia de seus hospedeiros, sendo os CoVs aviários a mais provável fonte de genes dos grupos *Gamma* e *Deltacoronavírus* enquanto vírus de morcegos teriam originado os grupos *Alpha* e *Betacoronavírus* (Figura 13) (WERTHEIM, et al. 2013)

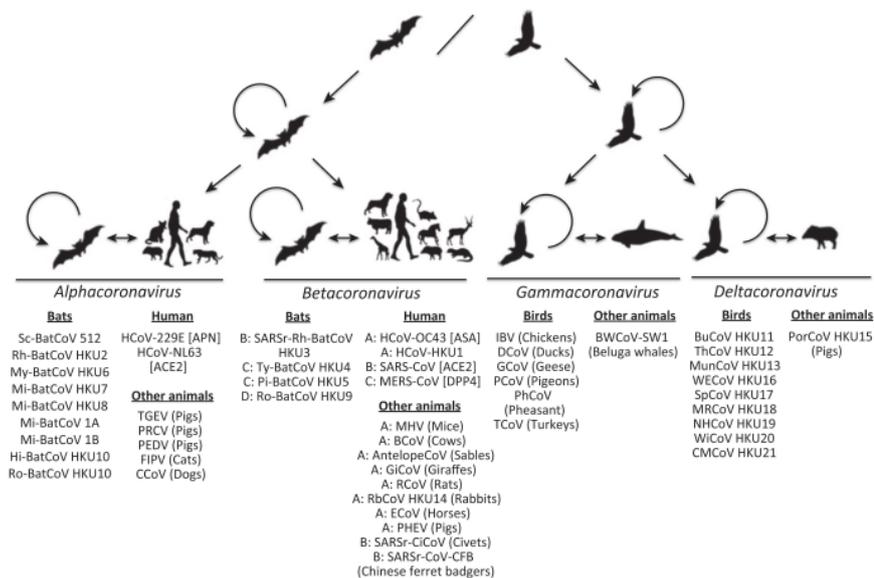


Figura 13 Modelo de evolução dos Coronavírus onde os morcegos seriam a fonte de genes de Alphacoronavírus e Betacoronavírus e as aves a fonte de genes de Gammacoronavírus e Deltacoronavírus (Fonte: WERTHEIM, et al. 2013).

Atualmente, são conhecidos CoVs em uma grande variedade de animais, causando doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas de gravidade variável. O primeiro CoV descoberto foi o causador da doença da bronquite infecciosa, isolado de embriões de galinha em 1937, seguido do Vírus da Hepatite Murina (MHV) e outros Coronavírus de mamíferos em 1940 e dos CoVs humanos HCoV-229E e HCoV-OC43 em 1960 (WERTHEIM et al., 2013). O surgimento do SARS-CoV em 2002, representou uma nova era na história da pesquisa dos CoVs, gerando interesse na pesquisa CoVs nos mais diversos animais. Um importante achado foi a identificação de morcegos como o reservatório natural do vírus, assim como o papel das civetas e outros mamíferos como hospedeiros intermediários e amplificadores do SARS-CoV (WOO et al., 2010).

Além da SARS, há outros exemplos de transmissão de CoVs entre espécies não relacionadas. O CoV bovino (BCoV) e o CoV humano HCoV-OC43 são bastante similares, com 99% de identidade e provavelmente protagonizaram um fenômeno de *shift* bastante recente. O BCoV também apresenta 99,5% de similaridade com um CoVs isolado de uma

alpaca com enterite e com ruminantes silvestres. Além disso, o CoVs canino (CCoV), o CoVs felino (FCoV) e o CoVs suíno da Gastroenterite Transmissível (TGEV) mostram evidências de recombinação entre si, indicando que, em algum momento, estiveram presentes no mesmo hospedeiro. Recombinações entre o CCoV-I e o FCoV-I com um terceiro CoV desconhecido geraram os CoVs CCoV-II e FCoV-II. O CCoV-II, por sua vez passou a infectar suínos, transformando-se no TGEV. Essas relações foram esquematizadas na figura 14 (PERLMAN S.; NETLAND J., 2009).

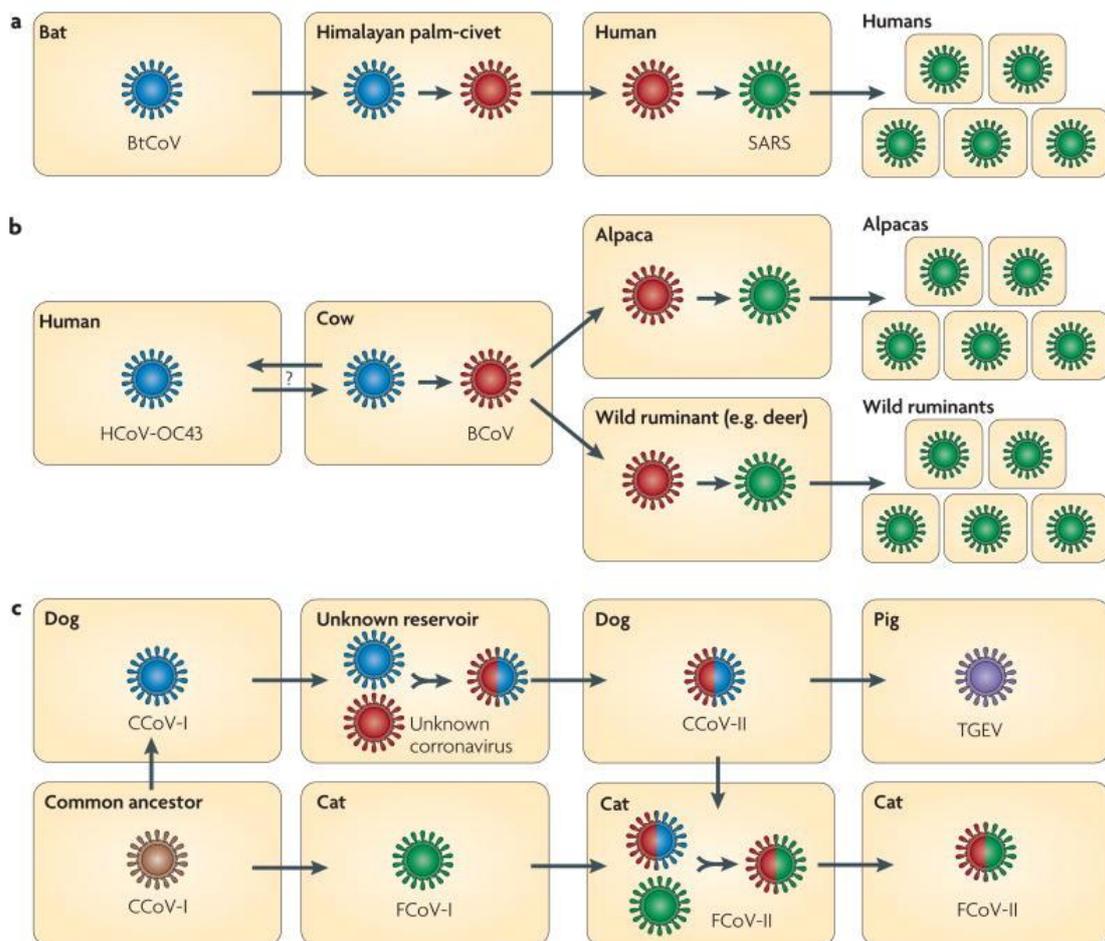


Figura 14 Exemplos de transmissão de coronavírus entre hospedeiros não relacionados. **a)** O Coronavírus de morcego (BtCoV), semelhante à SARS, se adaptou à transmissão entre animais silvestres como a civeta e, posteriormente, passou a replicar-se eficientemente no homem, podendo ser transmitido pessoa para pessoa. **b)** O Coronavírus humano OC43 e o Coronavírus bovino BCoV se originaram em uma mesma espécie. O BCoV também cruzou a barreira entre espécies e passou a infectar diversos outros animais, como a alpaca e outros ruminantes silvestres. **c)** O Coronavírus Felino I (FCoV-I) e o Coronavírus Canino I (CCoV-I) provavelmente possuem um ancestral comum. CCoV-I se recombina com um Coronavírus desconhecido gerando o Coronavírus Canino II (CCoV-II) que, por sua vez, recombina-se com FCoV-I gerando o Coronavírus Felino II (FCoV-II) e ainda passou a infectar suínos, resultando no Vírus da Gastroenterite Transmissível (TGEV) (Fonte: PERLMAN S.; NETLAND J. 2009).

Em um evento ainda mais recente, o Coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) emergiu com uma taxa de mortalidade superior a 35%, matando mais de 700 pessoas de 27 países incluindo todo o Oriente Médio, Europa, Norte da África e Ásia (CHAFEKAR et al., 2018). Estudos demonstram que, mais uma vez, trata-se de um evento de *spillover* de um vírus originário de morcegos, que passou a acometer camelídeos e chegou ao homem (DUDAS et al., 2018).

Outro evento recente, desta vez envolvendo diretamente CoVs aviários, foi a emergência do *Deltacoronavírus Porcino* (PDCoV, também chamado HKU15). Este CoV foi identificado inicialmente em porcos em Hong Kong no final dos anos 2000, espalhando-se pelo mundo causando grandes perdas econômicas (LAU et al., 2018). Estudos mostraram que o PDCoV está mais intimamente relacionado ao CoV de pardal *HKU17* (LI et al., 2015). A análise parental do genoma mostra que esses dois vírus são subespécies da mesma espécie com superior a 96% de identidade de aminoácidos nos domínios usados para demarcação de espécies, indicando que um evento de transmissão interespecies de aves a mamíferos deve ter ocorrido há relativamente pouco tempo (LAU et al., 2018). Curiosamente, as proteínas S do CoV de passariforme *Bulbul HKU11* e *Munia CoV HKU13* mostram maior identidade de sequência com a proteína S do PDCoV do que a do CoV de pardal *HKU17* (70,2% e 71,2% vs. 44,8%), sugerindo que houve uma recombinação previa à emergência desse CoV suíno (WOO et al., 2012).

2.9 Metagenômica

Os vírus podem ser identificados por uma ampla gama de técnicas, baseadas principalmente em comparações com vírus previamente conhecidos. Historicamente, as técnicas diagnósticas incluem microscopia eletrônica, cultura de células, inoculação em animais de laboratório e sorologia, mas esses métodos têm limitações. Por exemplo, muitos vírus não podem ser cultivados, excluindo o uso de isolamento em cultivo celular e técnicas sorológicas, e só podem ser caracterizados por métodos moleculares (TEMMAM et al., 2014).

Embora as técnicas de PCR tenham permitido a descoberta de muitos vírus, é necessário o conhecimento prévio da sequência de vírus semelhantes. É neste sentido que a metagenômica se faz útil, enquanto uma abordagem que permite a identificação de microrganismos pouco conhecidos, tornando-se uma ferramenta alternativa para o estudo da taxonomia viral através da tecnologia de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) (ONSUMAKINDE et al., 2018).

São chamados de NGS métodos de sequenciamento massivos que, ao contrário do método de Sanger, não dissociam a incorporação dos nucleotídeos da separação dos fragmentos e aquisição dos dados, permitindo que dezenas de milhares a bilhões de pares de bases sejam lidos simultaneamente (SLATKO, GARDNER & AUSUBEL, 2018).

A primeira das tecnologias comerciais incluídas nesta categoria foi o pirosequenciamento, com a plataforma 454-Roche[®], introduzida em 2004. Essa tecnologia utiliza a detecção luminescente de um pirofosfato liberado após a incorporação de um nucleotídeo (MARDIS, 2008), produzindo sequências relativamente longas de 400 kb (chamadas de “leituras” ou “reads”), alta capacidade de geração de dados (*throughput*) mas com grande desvantagem na leitura de regiões homopoliméricas (LUO et al., 2012).

Nos anos que se seguiram, outras duas plataformas surgiram: a Illumina[™] e SOLiD[®] (Sequencing by Oligo Ligation Detection). Com uma tecnologia denominada Solexa[™], a Illumina utiliza nucleotídeos rotulados com fluorescência reversível (MARDIS, 2008), tendo como vantagem principal o alto *throughput* e sequências entre 150 e 300 pb mas apresenta problemas na leitura de sequências com alto teor GC (SLATKO, GARDNER & AUSUBEL, 2018). A plataforma SOLiD[®], por sua vez, trabalha em função da hibridização de sondas fluorescentes e gera um grande volume de informação, entretanto, limitada a leituras bastante pequenas com apenas 75pb (MARDIS, 2017).

Em 2011, a plataforma Ion Torrent[™] foi introduzida, com uma tecnologia conceitualmente diferente, que detecta as pequenas alterações no pH causadas pelos íons H⁺ liberados durante a incorporação do nucleotídeo correto no microambiente ao redor de esferas contendo as moléculas de DNA amplificadas clonalmente (McCOMBIE, McPHERSON & MARDIS, 2018). Essa plataforma oferece leituras de tamanho próximo a 200 pb, menor do que as leituras fornecidas por algumas versões da Illumina e pelo 454-Roche, o que é a maior desvantagem da técnica. Entretanto, a traz melhorias na detecção de homopolímeros, uma vez que, a cada nucleotídeo incorporado, apenas um íon H⁺ é liberado, levando a uma proporção direta que pode ser medida de forma mais acurada do que nas tecnologias com detecção por imagem (SLATKO, GARDNER & AUSUBEL, 2018). Outra vantagem, é a possibilidade de personalização na escolha dos reagentes e chips de sequenciamento, o que adequa melhor a técnica ao orçamento disponível e ao objetivo do pesquisador.

Apesar destas plataformas serem baseadas em princípios bastante diversos, seus fluxos de trabalho são conceitualmente similares. A primeira etapa ocorre com a preparação da biblioteca, quando é realizada a fragmentação aleatória do DNA, seguida da reação de ligação dos adaptadores. Em seguida, tem início a fase de PCR, ou seja, uma amplificação prévia na

qual os amplicons derivados de um determinado fragmento da biblioteca são agrupados em um único local em um substrato plano, ou na superfície de microesferas (McCOMBIE, McPHERSON & MARDIS, 2018).

As gerações mais recentes de plataformas, entretanto, se diferenciam pela capacidade de sequenciar moléculas únicas, sem a exigência da etapa de amplificação de DNA, em tecnologias agrupadas na categoria de Sequenciamento de Moléculas Únicas (Single Molecule Sequencing- SMS) (HEATHER & CHAIN, 2016). Nesta categoria está incluso o PacBio Biosciences[®] (Pacific Biosciences), que utiliza uma tecnologia de *Single Molecule Real Time* (SMRT), na qual células de fluxo especiais que abrigam poços individuais com fundos transparentes, contendo uma única polimerase fixa na parte inferior (chamado de guia de ondas de modo zero-ZMW). Cada ZMW permite que uma única molécula de DNA (previamente circularizada na preparação da biblioteca) progrida. Quando as bases são incorporadas pela polimerase, sua marcação produz um pulso de luz que a identifica (LEVENE et al., 2003; ARDUI et al., 2018).

Outra plataforma que também utiliza tecnologia SMS é a MinION[®] (Oxford Nanopore Technologies), na qual uma diferença de potencial é aplicada em uma membrana contendo milhares de poros, cada um contendo uma molécula de enzima que serve como biosensor (DEAMER et al., 2016). No momento em que uma molécula de DNA atravessa esses poros gera uma corrente que é modificada com uma intensidade diferente por cada nucleotídeo (A, C, T ou G), tornando possível sua identificação. Essa tecnologia tem como característica um hardware extremamente compacto, que possibilita seu uso a campo (MANTERE, KERSTEN & HOISCHEN, 2019).

Essas tecnologias trazem como vantagens, o fato de excluïrem a etapa de amplificação da biblioteca, o que resulta em uma cobertura mais uniforme, e a produção de grandes leituras, superiores a 10kb (VanDIJK et al., 2018). No entanto, essas plataformas ainda possuem taxas de erro mais altas, podendo formar regiões quiméricas. Outra limitação está na etapa análise uma vez que o alto volume de dados gerado demanda ferramentas de bioinformática superiores (SEDLAZECK, et al., 2018; MANTERE, KERSTEN & HOISCHEN, 2019).

Muitas abordagens foram previamente aplicadas na tentativa de otimizar análises metagenômicas para detecção de vírus, foram utilizadas como base diferentes tipos de amostra, protocolos e plataformas de sequenciamento em trabalhos (TEMMAN et al., 2014; CONCEIÇÃO-NETO et al., 2015). Por haver uma enorme miríade de possibilidades, nenhuma tentativa foi totalmente eficaz na padronização pois diferentes técnicas devem ser combinadas na dependência da amostra a ser analisada e objetivos do estudo (NOOJI et al., 2018).

Diversos trabalhos foram realizados para estudo do viroma aviário através de metagenômica em amostras de aves domésticas (ZHANG et al., 2014; SHANG et al., 2018; CHOI, LEE & SUL, 2015). Estudos deste mesmo tipo em amostras de aves silvestres, por sua vez, se provam mais desafiadores por fatores como a variedade de espécies das quais estas amostras são provenientes e de vírus encontrados, viabilidade, contaminantes, dificuldade na obtenção das amostras, baixa quantidade de amostra disponível, baixa carga viral que estes animais normalmente apresentam etc. (TEMMAN et al., 2014)

Exemplos de trabalhos que incluem detecção viral através de metagenômica em amostras de aves silvestres são o trabalho realizado por Honkavuori et al. (2014), que foi capaz de detectar novos CoVs e Astrovírus em fezes de aves migratórias da baía de Delaware através da plataforma 454-Roche®; a pesquisa feita por Souza et al. (2019), que encontraram novos Astrovírus e Calicivírus em aves migratórias no estado de Pernambuco, Brasil, com a plataforma Illumina™ e Vibin et al. (2018) que desenvolveram uma metodologia baseada na plataforma IonTorrent™ para detecção metagenômica e caracterização de vírus em amostras de fezes de aves selvagens australianas, obtendo sucesso, inclusive, na detecção de CoVs.

Monitorar o estado do viroma dos reservatórios aviários contribui no controle e prevenção de surtos de doenças virais emergentes ou re-emergentes. Estudos de filogenia que associam geográfica com a variabilidade viral permitem melhor entendimento da epidemiologia e eventuais transmissões interespecíficas. Essa compreensão ganha especial importância quando relativos a vírus que, assim como os CoVs, possuem conhecido potencial para acumular mutações e efetuar *shifts* gênicos.

3 OBJETIVOS

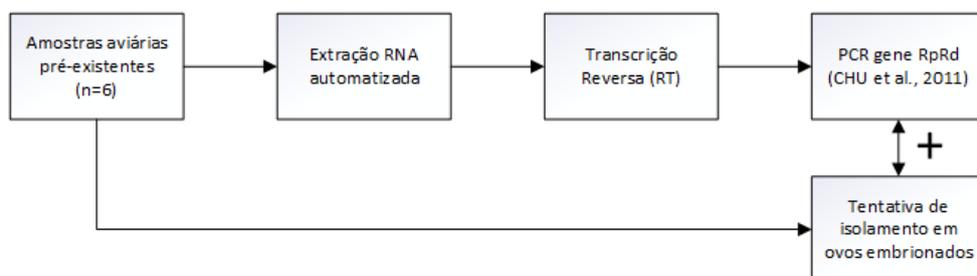
- a) Detectar a presença de coronavírus por Nested RT-PCR em amostras de swab traqueal e cloacal provenientes de aves migratórias e residentes de diferentes regiões brasileiras.
- b) Sequenciamento do genoma completo dos coronavírus detectados através de plataformas de sequenciamento de nova geração.
- c) Analisar e discutir as sequências nucleotídicas de coronavírus obtidas, mediante análises filogenéticas.
- d) Discutir aspectos da cadeia epidemiológica do agente, aspectos migratórios e sua interface com populações humanas e animais.

d) Correlacionar os dados obtidos às rotas de migrações de aves, à proximidade das regiões urbanas e de granjas avícolas, verificando o risco para saúde humana e animal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os métodos e a sequência de atividades deste estudo estão esquematicamente apresentados na figura 15.

Protocolo piloto para caracterização de coronavírus



Protocolo de produção para caracterização de coronavírus

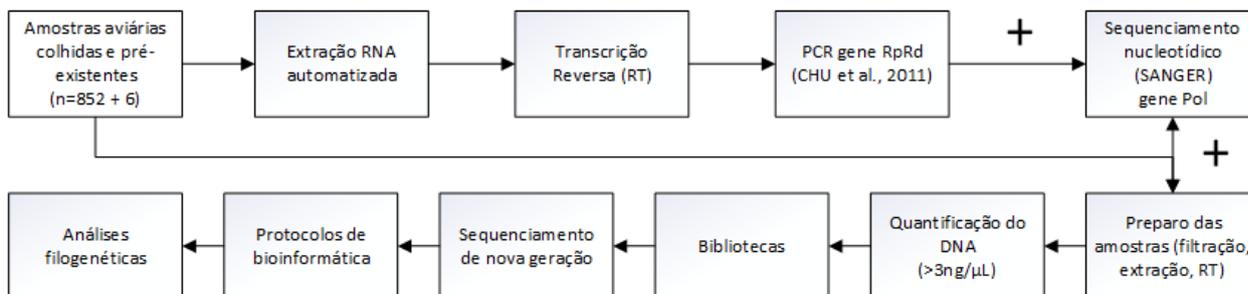


Figura 15 Fluxograma das atividades realizadas visando a caracterização viral das amostras aviárias empregadas neste estudo.

4.1 Amostragem

Para este trabalho foram utilizadas 6 amostras de swabs orais e cloacais de aves silvestres e domésticas, positivas para a presença de coronavírus de acordo com o protocolo de triagem de Chu et al. (2006) e confirmadas por sequenciamento nucleotídico (Sanger) (tabela 2). O emprego destas amostras visa complementar os estudos desenvolvidos no projeto de mestrado intitulado “Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil” (BARBOSA, 2015) (Tabela 1).

Tabela 1 Amostras positivas para coronavírus provenientes do projeto de mestrado intitulado “Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil” (BARBOSA, 2015), de acordo com o ano e localidade.

Número da Amostra	Identificação	Local de Coleta	Hospedeiro	Ano de Coleta
1	DPV 5	Parque do Ibirapuera (São Paulo)	<i>Anser cygnoides</i>	2015
2	DPV 10	Parque do Ibirapuera (São Paulo)	<i>Anser cygnoides</i>	2015
3	DPV 16	Parque do Ibirapuera (São Paulo)	<i>Anser cygnoides</i>	2015
4	PNLP 100	Parque Nacional da Lagoa do Peixe (Rio Grande do Sul)	<i>Calidris alba</i>	2009
5	PNLP 115	Parque Nacional da Lagoa do Peixe (Rio Grande do Sul)	<i>Rynchops niger</i>	2009
6	PNLP 159	Parque Nacional da Lagoa do Peixe (Rio Grande do Sul)	<i>Calidris fuscicollis</i>	2009

Ao número amostral, foram adicionadas mais 852 aves, coletadas entre os anos de 2016 a 2019 gentilmente cedidas pela equipe de campo do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular. Elas foram provenientes das regiões nordeste, sudeste e sul do Brasil e estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 Localidades e número de amostras analisadas e resultados das análises de Nested-PCR das amostras coletadas durante o presente estudo.

Local	Número de amostras testadas
Panaquatira (Maranhão)	45,3 % (386/852)
Mairiporã (São Paulo)	10,2% (87/852)
Ilha Comprida (São Paulo)	21,4% (182/852)
Parque Nacional de Jurubatiba (Rio de Janeiro)	12,3% (105/852)
Parque Nacional da Lagoa do Peixe (Rio Grande do Sul)	10,7% (91/852)
Total	100% (852)

4.2- Extração de Material Genético Total

Após a coleta, os swabs foram eluídos em em criotubo contendo 500µL de Viral Transport Media (VTM) (2.000U de penicilina G, 2,5µg de estreptomicina, 6µg de gentamicina, 25µg de Anfotericina B, 1,0% de albumina bovina, 20% de glicerina) e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Durante a preparação para extração, as amostras são descongeladas lentamente em geladeira e homogeneizadas em vórtex.

A extração das amostras foi realizada no Laboratório "Prof. Dr. Klaus Eberhard Stewien", de Biossegurança nível 3+ no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de

São Paulo (USP), utilizando o equipamento de extração automatizada MagMAX™ Express (Applied Biosystems®) e o kit de reagentes MagMAX™ Total Nucleic Acid Isolation Kit para extração de material genético total .

Para tal, são preparadas 6 placas: à primeira foram adicionados 300µL de *Lysis Buffer* e, que foram incubados por 10 minutos e adicionados de 40µL de *beads* magnéticas. Na segunda e terceira placas foram colocados 150µL de *Buffer 1*. À quarta e quinta placas foram adicionados 150µL de *Buffer 2* e, finalmente, à sexta placa foram adicionados 75µL de *Elution Buffer*.

O *Lysis Buffer* adicionado à amostra realiza a lise das células e membranas presentes na amostra, enquanto o robô utiliza uma placa magnética sob a microplaca para que as esferas metálicas (*beads*) ligadas ao material genético, não sejam removidas durante as lavagens.

Foram realizadas duas lavagens, sob agitação (900 G por 2 minutos, à temperatura ambiente), nas placas 2 e 3 contendo *Buffer 1*, e outras duas lavagens sob agitação (900 G por 2 minutos, à temperatura ambiente) nas placas 4 e 5, contendo *Buffer 2*.

Em seguida, a máquina realiza nova agitação a 900 G por 3 minutos na última placa, contendo o *Elution Buffer*, que inverte a polaridade das *beads* magnéticas, visando separar o material genérico aderido.

Finalmente, material extraído foi transferido para microtubos *nuclease-free* e armazenado em ultra-freezer (-80°C) até seu processamento.

4.3 Transcrição Reversa

Uma vez extraído, o RNA obtido foi submetido à reação de Transcrição Reversa, utilizando o “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” com a finalidade de se obter o DNA complementar (cDNA). Para cada reação, 10µL do RNA extraído de cada amostra foram utilizados e adicionados de 2µL de RT Buffer 10X, 2µL de Random Primers (50 ng/µL), 4,2 µL de água DEPC e 50 U de enzima “MultiScribe™ Reverse Transcriptase”. Essa reação foi então colocada no termociclador a 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e resfriadas a 4°C até serem retiradas.

4.4 Triagem de amostras positivas para coronavírus

Utilizando o protocolo de detecção genérica de coronavírus desenvolvido por Chu et al. (2011), que utiliza como alvo o gene da R_pRd presente no ORF 1 do genoma viral, foi realizada

uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguida de uma Nested-PCR originando um fragmento de 440 pares bases (pb). A sequência dos primers encontra-se na figura 16.

PCR Primers

Forward Primer: 5'-GGKTGGGAYTAYCCKAARTG-3'

Reverse Primer: 5'-TGYTGTSWRCARAAAYTCRTG-3'

Nested PCR Primers

Forward Primer: 5'-GGTTGGGACTATCCTAAGTGTGA-3'

Reverse Primer: 5'-CCATCATCAGATAGAATCATCAT-3'

Figura 16 Sequência dos primers utilizados para as reações de PCR e Nested-PCR, para diagnóstico genérico de coronavírus, que têm como alvo o gene da RpRd (CHU et al. 2011).

Para realizar o PCR, foram transferidos 3,0µL do cDNA de cada amostra aos poços de uma nova placa de 96 orifícios), 2,5µL de Buffer 10X, 1,25µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL de dNTP (10µM), 2,5µL de PCR Primer Forward (10µM), 2,5µL de PCR Primer Reverse (10µM), 0,125µL da enzima TaqTM DNA Polymerase e 12,625µL de água DEPC. A reação foi então colocada no termociclador a 94°C por 2 minutos e 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos, 72°C por 7 minutos e mantido a 4°C após o final dos ciclos.

Já para a Nested PCR, em uma nova placa, foram colocados 2,0µL do produto de PCR, 2,5µL de Buffer 10X, 1,25µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL de dNTP (10mM), 1,25µL de Nested PCR Primer Forward (10µM), 1,25µL de Nested PCR Primer Reverse (10 pMol/µL), 0,125µL da enzima TaqTM DNA Polymerase e 16,125µL de água DEPC, submetidos às mesmas condições de tempo e temperatura descritas para a reação de PCR.

Os materiais amplificados foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídeo, a 120 V por 60 minutos e visualizado sob luz ultravioleta. As amostras que apresentaram bandas de 440 pb esperadas na reação de Nested, foram consideradas positivas.

4.5 Sequenciamento pelo método de Sanger

Para a purificação dos produtos da PCR e Nested nas amostras que não apresentaram bandas inespecíficas na eletroforese em gel de agarose foi realizado o protocolo do Kit ExoSap-IT[®](Affymetrix), enquanto naquelas que apresentaram bandas inespecíficas, o GeneJETTM Gel

Extraction Kit (Thermo Scientific) foi utilizado, ambos de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) e colocadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700. Em seguida, as amostras foram purificadas usando o BigDye X Terminator[®] Purification kit (Applied Biosystems) e aplicadas no sequenciador automatizado ABI PRISM 3130XL DNA Sequencer (Applied Biosystems). A fim de confirmar quais sequências pertenciam de fato a coronavírus, elas foram submetidas ao Blast-n do GenBank, na página do NCBI (National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

4.6 Isolamento em ovo embrionado

As amostras positivas provenientes do projeto de mestrado intitulado “*Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil*” (BARBOSA, 2015) e utilizadas no protocolo piloto de caracterização dos Coronavírus foram inoculadas em ovos embrionados. Para o isolamento, ovos embrionados de galinha SPF (*Specific Pathogens Free*), com 9 dias foram visualizados ao ovoscópio para avaliação da viabilidade de embriões e integridade da casca, bem como para a delimitação da câmara de ar e identificação com o número da amostra correspondente.

As amostras foram então centrifugadas a 10000G durante 5 min, adicionadas de 10% de estreptomicina e 5% de griseofulvina e incubadas por 1 hora em geladeira. Após antissepsia e perfuração de um orifício na casca, o volume de 100 µL de amostra tratada foi inoculado na cavidade amniótica e alantóide. Os ovos ficaram incubados em estufa 72 horas a 37,5 °C e, em seguida foram refrigerados a 4 °C por 12 horas. Foram então coletados 1 ml do fluído alantóico, do qual 100 µL foram utilizados para a segunda inoculação (segunda passagem) em ovo embrionado repetindo-se o procedimento por um total de 3 passagens.

Alíquotas das 3 passagens das 6 amostras foram extraídas, submetidas à reação de transcriptase reversa e reação de Nested PCR conforme protocolo de triagem descrito no item 4.4.

4.7 Preparação das amostras para sequenciamento na plataforma Ion Torrent S5™ System

4.7.1 Filtração e purificação das amostras

Inicialmente, as amostras foram passadas em filtro de 0,45 µm. Uma reação contendo 233 µL de amostra filtrada, 30 µL de Buffer DNase 10x, 25 µL Turbo™ DNase (Ambion®) (2U/µL) e 12 µL RNase Cocktail Enzyme mix (Ambion®) foi preparada resultando em 300 µL volume final que foi incubado a 37 °C por 2 horas.

4.7.2 Extração do RNA

Um volume de 750µL de Trizol® LS foram adicionados a cada tubo de amostra tratada com DNase/RNase, conforme descrito anteriormente. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, 200 µL de clorofórmio foram colocados na reação que foi então submetida ao vórtex por 15 segundos. Os tubos foram novamente incubados, desta vez em gelo, por 10 minutos e posteriormente centrifugados a 12.000G/4°C por 15 minutos.

O sobrenadante foi transferido à um novo tubo, ao qual foram acrescentados 500 µL de etanol gelado e submetida ao vórtex por 15 segundos. Em seguida 700µL desta mistura foram transferidos por vez para a coluna (RNeasy mini spin) e centrifugados a 12.000G por 30 segundos. O filtrado (*flow-through*) resultante no tubo coletor foi descartado e o processo repetido até todo o volume da amostra ser passado pela coluna.

O volume de 700 µL do Buffer RW1 foi então passado pela coluna, centrifugada a 12.000G por 30 segundos (para lavar a coluna) e o filtrado descartado. 500 µL do Buffer RPE foram adicionados na coluna e centrifugados a 12.000G por 30 segundos, e o filtrado, descartado. Mais 500 µL do Buffer RPE foram adicionados à coluna e centrifugado a 12.000G, desta vez, por 2 minutos.

A coluna foi colocada em um tubo novo, centrifugada na velocidade máxima por 1 minuto e transferida para um microtubo de 1,5mL livre de nucleases. Para eluir o RNA preso à membrana da coluna, foram adicionados 50µL de água RNase-free e centrifugados a 12.000G por 1 minuto.

4.7.3 Transcrição reversa e síntese da segunda fita

Para reação de transcrição reversa foi utilizado o “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” conforme protocolo descrito pelo fabricante. Para a síntese da segunda fita de DNA, foi adicionado o volume de 0,5µL de 3’-5’ exo – Klenow DNA Polimerase (Ambion) em cada microtubo contendo cDNA recém-sintetizado que foi então incubado a 37°C por 60 minutos e 75°C por 10 minutos.

4.7.4 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada utilizando o fluorímetro Qubit™ 2.0 (Invitrogen). Para tal, em um microtubo específico, de parede fina transparente, 199µL de Qubit™ Working Solution foram adicionados a 1µL do DNA dupla-fita, agitados em vórtex por 3 segundos, incubados por 3 minutos e lidos no aparelho. Foram selecionadas amostras com concentração superior a 3,0ng/µL

4.7.5 Preparo da Biblioteca

4.7.5.1 Fragmentação do DNA

O passo inicial de preparo da biblioteca se dá pela fragmentação do DNA em dupla-fita. Para isso, foi utilizado o “Ion Xpress™ Fragment Library Kit” (Thermo Fisher Scientific), utilizando 5 µL de Reaction Buffer, 10 µL de Enzyme mix, volume de amostra suficiente para 100 ng de DNA e Água RNase-free suficiente para completar o volume final de 50 µL. A reação foi então submetida a incubação a 37 °C por 10 minutos seguida da aplicação de 5 µL de Stop Buffer.

Seguindo a fragmentação, foi feita a primeira purificação com o kit AMPure XP (Beckman Coulter). Para isso, foram adicionados 99 µL de beads aos 55 µL resultantes da reação anteriormente descrita, homogeneizados, incubados em temperatura ambiente por 5 minutos na bancada e em estante magnética por mais 3 minutos.

Foram colocados 500 µL de etanol a 70% preparado fresco a cada um dos tubos, que foram girados em 180° na estante e, após alguns segundos, girado novamente da mesma forma,

obrigando as *beads* ligadas ao DNA a passarem pela solução. O etanol foi então retirado pelo lado contrário aos pellets formados e aguardou-se até que ficassem completamente secos.

Os tubos foram finalmente retirados da estante adicionados de 25 µL de Buffer de Eluição (presente no kit) e submetida ao vórtex. Quando os tubos foram recolocados na estante, as *beads* se ligaram às paredes do tubo, enquanto o DNA diluído foi recolhido e transferido a um novo tubo.

4.7.5.2 Ligação dos adaptadores

A etapa seguinte foi realizada com o kit Ion Xpress™ Barcode Adapters (Thermo Fisher Scientific). Para este passo foram colocados os reagentes 10µL de Buffer 10X, 2µL de adaptadores, 2µL de um dos barcodes (um para cada amostra), 2µL de dNTP mix, 49µL de Água RNase-free, 2µL de DNA-ligase e 2µL de Repair Polimerase, assim como os 25µL de amostra resultantes da etapa anterior. A reação foi colocada em termociclador a 25°C por 15 minutos, 72°C por 5 minutos e 4°C até ser retirada. Uma nova purificação foi realizada, com o kit AMPure XP® (Beckman Coulter) conforme descrito anteriormente, entretanto, utilizando 120µL de *beads*.

4.7.5.3 Seleção dos fragmentos por tamanho

O volume total obtido foi aplicado em um gel de agarose E-Gel™ SizeSelect™ (Thermo Fisher Scientific) a 100V por 30 minutos para separação dos fragmentos com cerca de 200pb. Uma vez que atingem os poços livres do gel, os fragmentos do tamanho desejado foram eluídos em 10µL de água DEPEC e transferidos para tubos de 200µL.

4.7.5.4 Amplificação fragmentos

Utilizando primers que têm como alvo os adaptadores, foi realizado um PCR contendo 10µL da amostra, 5,0µL de 5X Platinum PCR Buffer, 5µL de dNTP (10µM), 1,0µL de PCR Primer Forward (10µM), 1,0µL de PCR Primer Reverse (10µM), 0,2µL da enzima Platinum II Taq™ Hot-start DNA Polymerase e água DEPEC até completar 25µL. A reação foi então colocada no termociclador a 94°C por 2 minutos e 25 ciclos de 94°C por 5 segundos, 60°C por 15 segundos, 68°C por 15 segundos e mantido a 4°C após o final dos ciclos.

4.7.5.5 PCR em emulsão e Sequenciamento

Para o preparo da PCR em emulsão foi utilizado o equipamento Ion Chef™ System com o kit Ion 540™. Foram diluídos 1µL de cada biblioteca em 24 µL de água *nuclease-free* e o total resultante foi aplicado nos tubos de amostra apropriados do kit. O aparelho foi preparado conforme as instruções do fabricante, dando início ao procedimento. Uma vez pronto, o chip foi transferido ao Ion S5™ System para o sequenciamento propriamente dito.

4.7.6 Leitura dos dados

4.7.6.1 Análise da qualidade dos dados e trimmagem das sequências de adaptadores

Os dados brutos foram recuperados do sequenciador no formato FastQ e submetidos ao “*trimming*” das sequências dos adaptadores e análise inicial da qualidade e cobertura das leituras utilizando o software FastQC v0.11.8 (PATEL & JAIN, 2012).

4.7.6.2 Análise individual das leituras e montagem com genoma de referência

As sequências listadas como as de maior identidade no serviço Blast-n do GenBank, (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>) com relação aquelas do ORF 1ab obtidas pelo sequenciamento pelo método Sanger, e que possuem genoma completo disponível, foram obtidas no banco de dados do GenBank (Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>) e utilizadas como genoma de referência. A montagem foi realizada através do software Geneious Prime versão 2019.2.1 (Disponível em: <<https://www.geneious.com/>>).

Para avaliar outros vírus que pudessem ter sido também detectados na metagenômica, os dados já tratados foram submetidos ao software Kraken 2 (WOOD & SALZBERG, 2014).

4.7.6.3 Análise filogenética

As relações filogenéticas para cada uma das sequências virais obtidas foram realizadas através do programa MEGA X (KUMAR et al., 2015). As árvores foram então construídas com

o mesmo software utilizando o método de *Neighbor joining* com os modelos de substituição definidos para cada sequência através do *Bayesian Information Criterion* (BIC). Foram ainda estipulados os valores de *bootstrap* a partir de 500 repetições.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do isolamento em ovos embrionados

As amostras utilizadas no protocolo de caracterização dos coronavírus descrito no item 4.6, foram inoculadas em ovos embrionados e os géis de agarose resultantes da análise por Nested-PCR das 3 passagens encontram-se representados nas figuras 17 e 18.

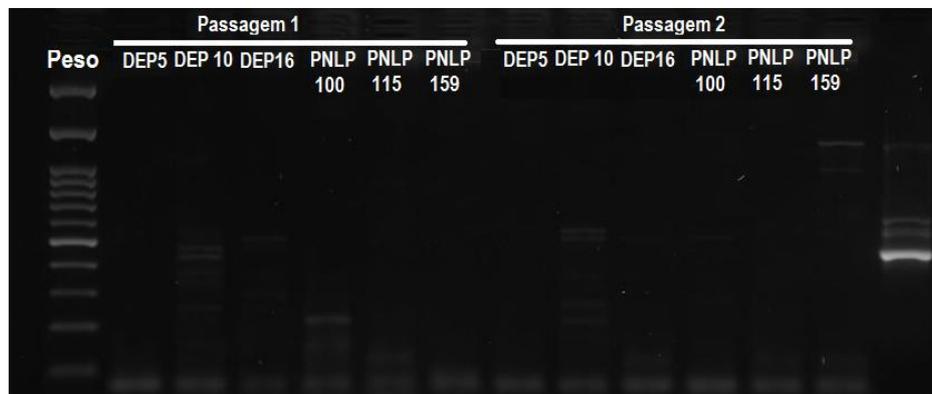


Figura 17 Gel de agarose relativo à reação de Nested PCR de alíquotas retiradas dos ovos embrionados inoculados, passagens 1 e 2. Último poço à direita contém o controle de reação da PCR BCoV.

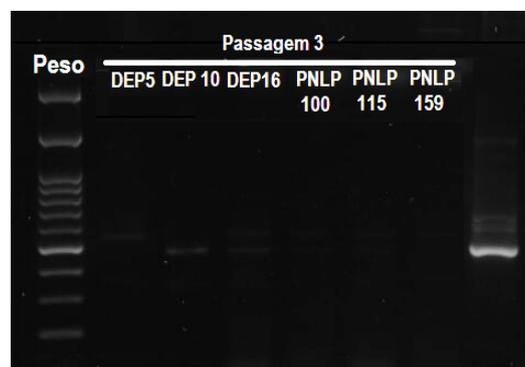


Figura 18 Gel de agarose relativo à reação de Nested-PCR de alíquotas retiradas dos ovos embrionados inoculados, passagem 3. Último poço à direita contém o controle de reação da PCR BCoV.

Face aos resultados apresentados, conclui-se que não houve sucesso no isolamento dos coronavírus presentes nestas amostras, razão pela qual o método de Sequenciamento de Nova Geração foi escolhido.

5.2- Triagem de amostras coletadas neste estudo

Foram analisadas 852 amostras pelo protocolo de triagem (CHU et al., 2011) resultando em 1,7% (15/852) de positivas na Nested-PCR das quais o sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger foi possível (Tabela 3).

Tabela 3 Número de amostras coletadas durante este estudo de acordo com a procedência, resultados das análises de Nested-PCR pelo protocolo de triagem para Coronavírus (CHU et al., 2011) e sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger.

Local	Número de amostras testadas	Positivas Nested-PCR	Positivas Sequenciamento Sanger
Panaquatira (Maranhão)	45,3% (386/852)	13,3% (2/15)	0% (0)
Mairiporã (São Paulo)	10,2% (87/852)	53,3% (8/15)	60% (3/5)
Ilha Comprida (São Paulo)	21,4% (182/852)	0% (0)	0% (0)
Parque Nacional de Jurubatiba (Rio de Janeiro)	12,3% (105/852)	0,2% (3/15)	40% (2/5)
Rio Grande do Sul (Parque Nacional da Lagoa do Peixe)	10,8% (92/852)	13,3% (2/15)	0% (0)
Total	852	15	5

As amostras cujo sequenciamento nucleotídico pelo método de Sanger foi possível pertenciam às espécies *Anas bahamensis* e *Calidris fuscicollis* (provenientes do Parque Nacional de Jurubatiba- Rio de Janeiro) e *Amazona aestiva* e *Anodorhynchus hyacinthinus* (Mairiporã- São Paulo) (Tabela 4).

Tabela 4 Amostras positivas para coronavírus sequenciadas pelo método de Sanger no presente estudo, de acordo com o ano e localidade.

Número da Amostra	Identificação	Local de Coleta	Hospedeiro	Ano de Coleta
1	PNRJ 46	Parque Nacional de Jurubatiba (Rio de Janeiro)	<i>Anas bahamensis</i>	2019
2	PNRJ 49	Parque Nacional de Jurubatiba (Rio de Janeiro)	<i>Calidris fuscicollis</i>	2019
3	Maripora 03	Mairiporã (São Paulo)	<i>Amazona aestiva</i>	2017
4	Maripora 08	Mairiporã (São Paulo)	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	2016
5	Maripora 27	Mairiporã (São Paulo)	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	2016

As amostras PNRJ 46 e PNRJ 49, provenientes do Parque Nacional de Jurubatiba no Rio de Janeiro, as amostras DEP5, DEP10 e DEP16, coletadas no Parque do Ibirapuera em São Paulo e PNLP 100, PNLP 115 e PNLP 159, de aves do Parque Nacional da Lagoa do Peixe no Rio Grande do Sul fazem parte de uma mesma rota migratória, a chamada Rota Atlântica. Já as amostras Maripora 03, Maripora 08 e Maripora 27, foram coletadas na cidade de Mairiporã, no interior de São Paulo, onde se encontra um fragmento de Mata Atlântica que é parte da Rota do Brasil Central. A relação da localidade das amostras sequenciadas positivas para coronavírus detectadas no presente estudo e provenientes do projeto de mestrado (BARBOSA, 2015) e rotas migratórias de aves silvestres encontra-se representada na figura 19.

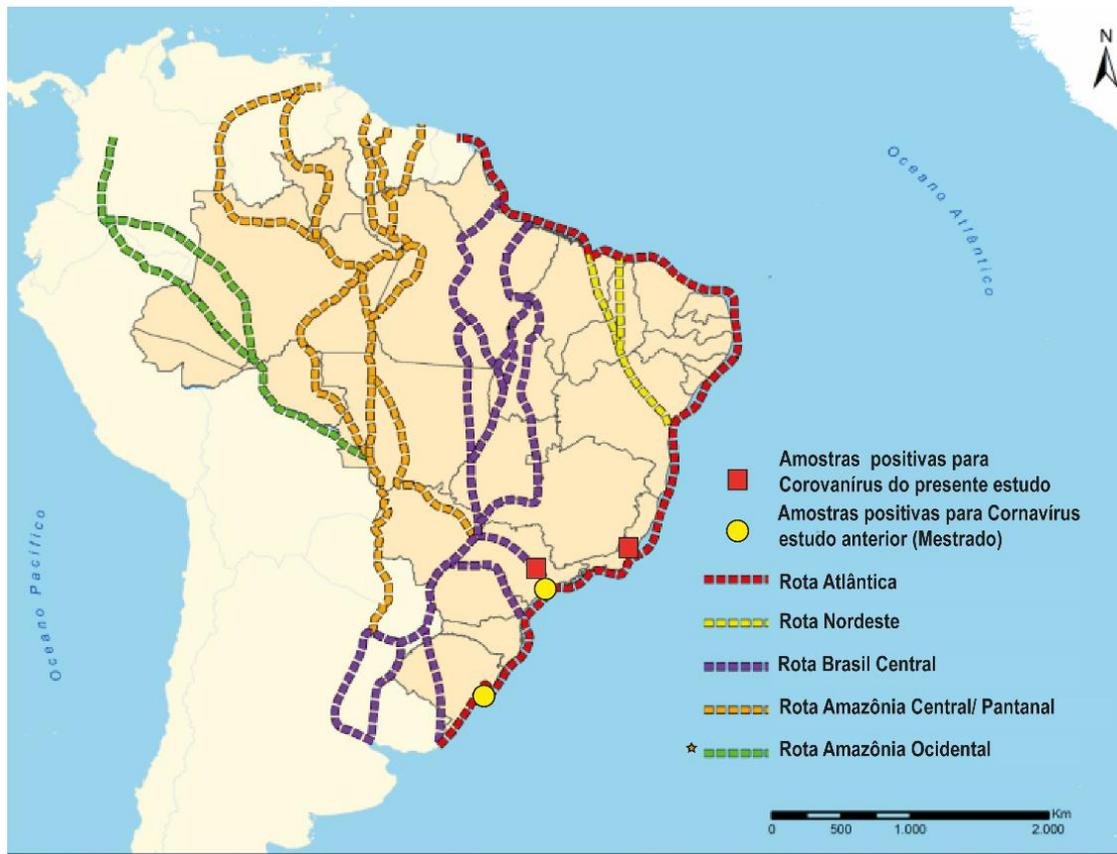


Figura 19 Mapa demonstrando a relação da localidade das amostras sequenciadas positivas para coronavírus às principais rotas migratórias do Brasil. Amostras detectadas no presente estudo encontram-se representadas por quadrados vermelhos. Amostras provenientes do projeto de mestrado intitulado “Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil” (BARBOSA, 2015), estão sinalizadas por círculos amarelos (Fonte: ICMBio, 2016- modificado).

A árvore filogenética do gene da RpRd foi construída a partir das sequências parciais de 440pb originadas deste sequenciamento nucleotídico está apresentada na figura 20.

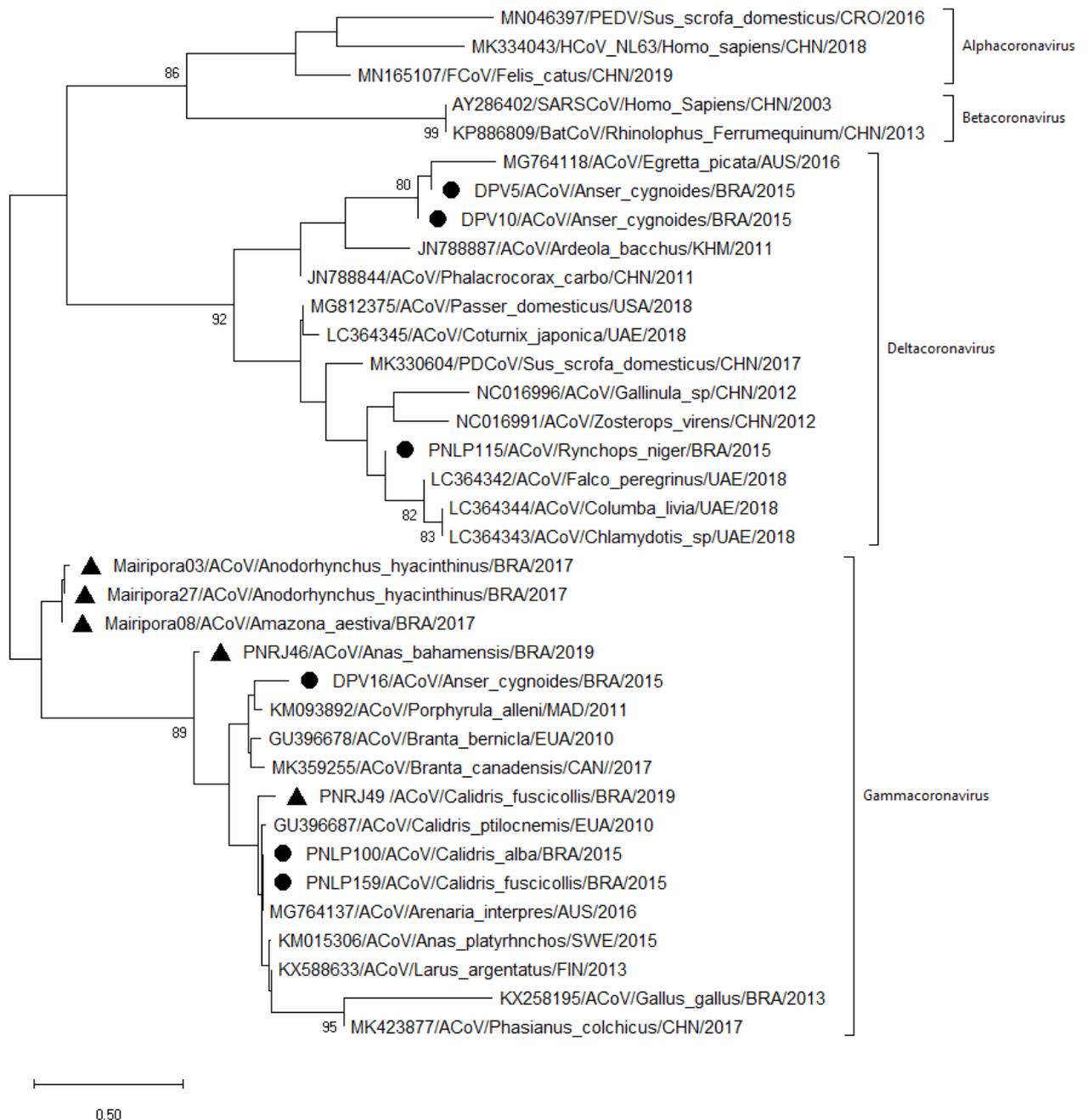


Figura 20. Árvore filogenética referente à sequência de 440pb da região codificante da RpRd do ORF1ab dos Coronavírus utilizando o método de *Neighbor joining*. Valores de *bootstrap* a partir de 500 repetições com valores superiores a 70 encontram-se acima dos respectivos nós. Amostras pertencentes ao projeto de mestrado intitulado “Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil” (BARBOSA, 2015), estão representadas por círculos. Sequências referentes às detecções realizadas durante o presente estudo estão representadas por triângulos.

5.3 Quantificação de DNA

As amostras que demonstraram sequências nucleotídicas no sequenciamento pelo método de Sanger foram novamente extraídas, desta vez utilizando Trizol[®] e colunas RNAeasy mini spin, com a finalidade de obter amostras melhor purificadas e com concentração superior.

Uma vez que a plataforma Ion S5[™] System exige concentração mínima inicial (*input*) de 100ng de DNA, foram selecionadas amostras com concentração superior a 3,0ng/μL. As quantificações estão listadas na tabela 5.

Tabela 5 Quantificação do DNA das amostras utilizando o fluorímetro Qubit[™] 2.0 (Invitrogen). Amostras demonstrando valores superiores a 3,0ng/μL. As amostras marcadas com asterisco foram escolhidas para o Sequenciamento de Nova Geração.

Amostra	Concentração (ng/mL)
DEP05	0,5
DEP10	0,9
DEP16	3,7*
PNLP100	0,3
PNLP115	2,7*
PNLP159	0,8
PNRJ46	13,0*
PNRJ49	3,9*
Mairiporã 03	3,9*
Mairiporã 08	4,15*
Mairiporã 12	3,2

5.3.1 Relatório de qualidade da corrida na plataforma Ion S5[™] System

O DNA das amostras selecionadas foi utilizado para preparo da biblioteca e foi submetido ao PCR por emulsão no Ion Chef[™] System com o kit Ion 540[™] e Sequenciamento propriamente dito na plataforma Ion S5[™] System. Os dados iniciais de qualidade destas leituras encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 Relatório de corrida indicando qualidade do Sequenciamento de Nova Geração contendo o número de bases e de leituras com histograma do tamanho das leituras geradas por amostra.

Amostra	Número de Bases	Número de Leituras	Histograma do tamanho das Leituras
DEP16	354,239,701	2,053,284	
PNRJ46	27,990,872	162,805	
PNRJ49	3,919,497,072	22,530,753	
Mairiporã 3	5,327,299,340	31,087,096	
Mairiporã 8	2,391,857,988	16,386,626	
Mairiporã 12	706,890,781	4,025,012	

5.4 Análise inicial das leituras

Os vírus detectados mediante a análise inicial pelo software Kraken 2, conforme descrito no item 4.7.6.2 (WOOD & SALZBERG, 2014) nesta etapa estão listados na tabela 7.

Tabela 7 Vírus detectados pelo software Kraken 2 (WOOD & SALZBERG, 2014) nas leituras geradas por amostra.

Amostra	Vírus Aviários
DEP16	Adenovírus Rotavírus Coronavírus
PNRJ46	Herpesvírus Adenovírus Rotavírus Flavivírus Coronavírus
PNRJ49	Influenza A Rotavírus
Mairiporã 3	Herpesvírus
Mairiporã 8	Herpesvírus Parrot Bornavírus 4
Mairiporã 12	Herpesvírus Parrot Bornavírus 4

5.4.1 Montagem dos genomas

As sequências listadas como as de maior identidade no serviço Blast-n do GenBank, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com relação aquelas do ORF 1ab obtidas pelo sequenciamento pelo método Sanger, e que possuem genoma completo disponível foram selecionadas e utilizadas como genoma de referência (Tabela 8).

Tabela 8 Relação da identificação da amostra com o número de acesso no GenBank das sequências de Coronavírus aviários selecionadas como genoma de referência, número dos nucleotídeos com relação ao genoma de referência e as respectivas posições em que se encontram.

Amostra	Genomas de Referência	Contigs Montados	Regiões
DEP16	MK359255	26232pb a 26639pb	Gene N
	LC364345	-	
	LC364342	-	
PNRJ46	MK359255	26173pb a 27408pb	Gene N e Região
	LC364345	-	Não Codificante
	LC364342	-	Terminal (3'UTR)
PNRJ49	MK359255	-	
	LC364345	-	
	LC364342	-	
Mairiporã 3	MK359255	-	
	LC364345	-	
	LC364342	-	
Mairiporã 8	MK359255	-	
	LC364345	-	
	LC364342	-	
Mairiporã 12	MK359255	-	
	LC364345	-	
	LC364342	-	

5.5 Análise filogenética das sequências do gene N e Região Não Codificadora Terminal (3'UTR)

As sequências geradas pelas amostras DEP16 e PNRJ46 foram alinhadas a sequências da região N de coronavírus disponíveis no GenBank. A árvore filogenética resultante encontra-se na figura 21.

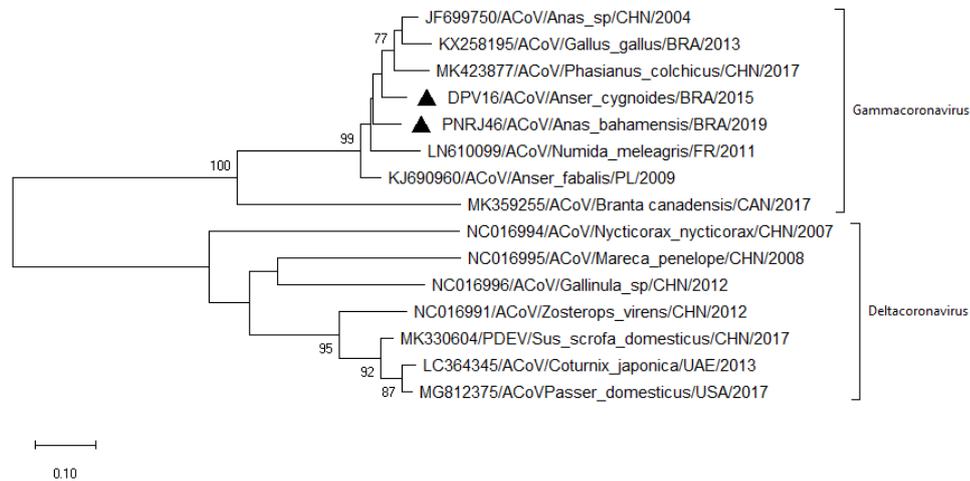


Figura 21 Árvore filogenética referente às sequências da região codificante da proteína N de Gammacoronavírus e Deltacoronavírus utilizando o método de *Neighbor joining*. Valores de *bootstrap* a partir de 500 repetições com valores superiores a 70 encontram-se acima dos respectivos nós. Sequências referentes às detecções realizadas durante o presente estudo estão representadas por triângulos.

A região sequenciada na amostra PNRJ46 também inclui a Região Não Codificadora Terminal (3'UTR). Para análise desta região foram selecionadas sequências desta região de Gammacoronavírus disponíveis no GenBank. A árvore filogenética referente ao alinhamento da região 3'UTR encontra-se na figura 22.

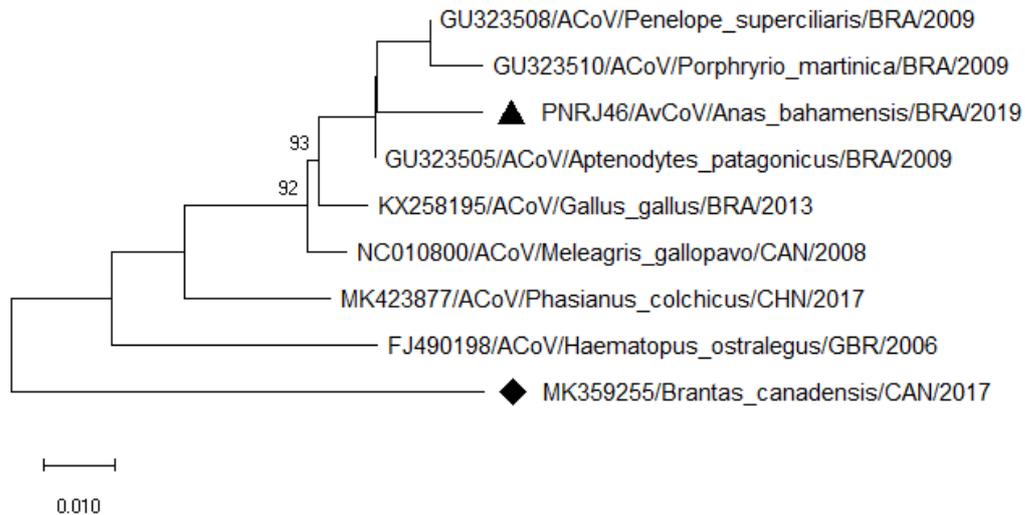


Figura 22 Árvore filogenética referente às sequências da região Não Codificante Terminal (3'UTR) dos Gammacoronavírus utilizando o método de *Neighbor joining*. Valores de *bootstrap* a partir de 500 repetições com valores superiores a 70 encontram-se acima dos respectivos nós. Sequências referentes às detecções realizadas durante o presente estudo estão representadas por triângulos. A sequência utilizada como genoma de referência para montagem está sinalizada por um losango.

6 DISCUSSÃO

Objetivando avaliar a melhor metodologia para a análise e caracterização filogenética dos CoVs aviários presentes em aves silvestres, as amostras detectadas durante projeto de mestrado intitulado “Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil” (BARBOSA, 2015), foram inoculadas em ovos embrionados (item 5.1), entretanto, sem sucesso conforme pode ser observado nas figuras 17 e 18.

Diversos autores não obtiveram sucesso no crescimento de CoVs de aves silvestres em ovos embrionados como mostrado nos trabalhos de Mudrassoli et al. (2010), Zhuang et al. (2015) e (JONASSEN et al., 2017) por isso, é possível que alguns Coronavírus encontrados em aves silvestres utilizem receptores espécie-específicos sendo incapazes de infectar ovos de galinha eficientemente.

Uma explicação consiste na baixa carga viral presente nas amostras. A grande maioria das aves coletadas encontram-se saudáveis em seu habitat e, quando são encontrados vírus, a carga viral geralmente é bastante baixa. Este fator é agravado pelo tempo decorrido entre a coleta e a análise além das múltiplas vezes que essas amostras foram descongeladas, o que reduz a quantidade de vírus viáveis.

Outra hipótese é a quantidade de passagens, que talvez não tenham sido suficientes. Uma vez que estes vírus não são provenientes de galinhas, eles não estão adaptados aos ovos

desta espécie. Quando são efetuadas mais passagens, há a possibilidade que o vírus se adapte e passe a crescer, entretanto, esse procedimento causaria a seleção dos vírus mais adaptados às células de galinha e o sequenciamento do produto deste procedimento talvez não venha a refletir a estirpe viral que de fato se encontra em circulação nos animais silvestres.

A fim de ampliar o número amostral, 852 amostras de aves silvestres foram submetidas ao protocolo de triagem (CHU et al., 2011) resultando em 1,7% (15/852) de positivas na Nested-PCR, item 5.2, todas pertencentes às regiões Sul e Sudeste do país (Figura 19). É possível que essa diferença se deva aos diferentes graus de urbanização de cada região. Regiões mais urbanizadas tendem a ter pontos de descanso e alimentação mais escassos e menores, levando à concentração de animais de diferentes espécies, incluindo animais sinantrópicos e domésticos, provenientes de diferentes locais em um mesmo espaço, o que predispõe às infecções virais como os CoVs.

A presença de CoVs nas regiões Sul e Sudeste levam ainda a uma outra preocupação: elas são as principais responsáveis pelas criações de frangos de corte e galinhas poedeiras, respectivamente.

Em 5 amostras do presente estudo foi possível sequenciamento nucleotídico do fragmento de ORF1ab (relativo à RpRd) pelo método de Sanger. Essas sequências foram somadas às 6 sequências obtidas no projeto de mestrado (BARBOSA, 2015) para inferência filogenética.

As sequências DPV5 e DPV10, ambas provenientes de amostras Gansos-africanos (*Anser cygnoides*) (Figura 23) do Parque do Ibirapura em São Paulo se mostraram pertencentes ao gênero *Deltacoronavirus*. Elas foram relacionadas a um clado que inclui somente CoVs de espécies de aves aquáticas como a Garça-real (*Egretta picata*) (Número de Acesso: MG764118) e a Garça chinesa (*Ardeola bacchus*) (Número de Acesso: JN788847).



Figura 23 Imagem de um Ganso Chinês (*Anser cygnoides*), espécie da qual as amostras DPV5 e DPV10, positivas para *Deltacoronavirus*, e a amostra DPV16, positiva para *Deltacoronavirus* foram provenientes (Fonte: <<https://www.wikiaves.com.br/>>).

O CoV encontrado na amostra de Talha-mar (*Rynchops niger*) (Figura 24) proveniente do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no Rio Grande do Sul (Identificação PNL115) também foi associada ao gênero *Deltacoronavirus*. O clado ao qual esta amostra pertence é formado por CoVs de diferentes espécies. Os Talha-mares (*Rynchops niger*) reproduzem-se na região central do Brasil e migram para a costa durante o inverno, percorrendo longas distâncias todos os anos, o que pode contribuir para disseminação dos CoVs.



Figura 24 Imagem de um Talha-mar (*Rynchops niger*), espécie da qual a amostra PNL115, positiva para *Deltacoronavirus*, foi coletada (Fonte: <<https://www.wikiaves.com.br/>>).

As amostras Mairiporã07 e Mairiporã23 foram coletadas de Araras-Azuis-Grandes (*Anodorhynchus hyacinthinus*) (Figura 25 A) enquanto Mairiporã03 pertence a um Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) (Figura 25 B), todas pertencentes à família *Psittacidae*. Estes animais eram mantidos em cativeiro em um mesmo sítio localizado na cidade de Mairiporã, em São Paulo. Os CoVs encontrados nestes animais são muito semelhantes entre si, entretanto divergentes dos demais, apesar de pertencerem ao gênero dos *Gammacoronavirus*. Esta divergência provavelmente se deve à falta de sequências disponíveis do GenBank desta região de CoVs, de aves pertencentes à família *Psittacidae* ou próximas, para comparação.



Figura 25: **A.** Imagem de uma Arara-Azul-Grande (*Anodorhynchus hyacinthinus*) espécies das quais as amostras Mairiporã07 e Mairiporã23, positivos para *Gammacoronavirus* neste estudo foram coletadas **B.** Imagem de um Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*) espécie da qual a amostra Mairiporã03, também positiva para *Gammacoronavirus* foi proveniente (Fonte: <<https://www.wikiaves.com.br/>>).

DPV16 e PNRJ49 pertencem a um Ganso-Africano (*Anser cygnoides*) (Figura 22) e uma Marreca-toicinho (*Anas bahamensis*) (Figura 26), respectivamente. Essas espécies são

pertencentes à ordem dos Anseriformes, mas possuem habitats diferentes: enquanto o Ganso-Africano vive em lagos de água doce, a Marreca-toicinho prefere lagos de água salobra, geralmente em regiões costeiras.

Os CoVs encontrados nestas amostras são próximos e formam um clado dentro do gênero *Gammacoronavirus*, juntamente a outros CoVs de aves aquáticas como o Ganso-de-Faces-Negras (*Branta bernicla*) (Número de Acesso: GU396678), o Ganso Canadense (*Branta canadensis*) (Número de Acesso: MK359255) e uma espécie de frango d'água (*Porphyrylla alleni*) (Número de Acesso:KM093892).



Figura 26: Imagem de um animal da espécie *Anas bahamensis* (Marreca-toicinho), espécie da qual a amostra PNRJ49, positiva para *Gammacoronavirus*, foi coletada (Fonte: <<https://www.wikiaves.com.br/>>).

As amostras PNRJ49 e PNL159 pertencem à espécie *Calidris fuscicollis* (Maçarico-de-Sobre-Branco) (Figura 27 A) enquanto a amostra PNL100 foi coletada de um *Calidris alba* (Maçarico-Branco) (Figura 27 B), todas aves da ordem dos *Charadriiformes*. Estas aves se reproduzem na região norte dos EUA e ao sul do Canadá, migrando para a América do Sul no inverno (ARAÚJO, 2018). Os CoVs encontrados nestas aves pertencem ao gênero dos *Gammacoronavirus* e agruparam-se em um clado contendo CoVs de outras aves desta mesma ordem como o vira-pedras (*Arenaria interpres*) (Número de Acesso: MG764137) e o Maçarico-das-Rochas (*Calidris ptilocnemis*) (Número de Acesso: GU396687).

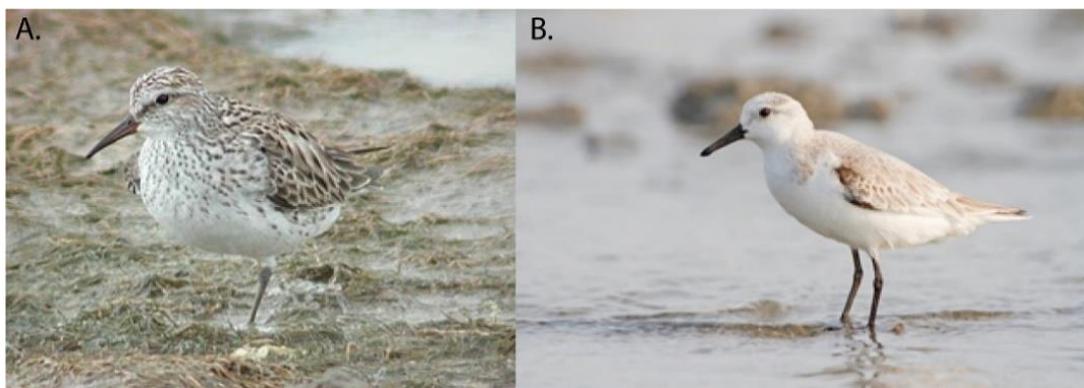


Figura 27: A. Maçarico-de-Sobre-Branco (*Calidris fuscicollis*). B. Maçarico-Branco (*Calidris alba*) espécie migratórias das quais foram provenientes as amostras PNRJ49 e PNL159, respectivamente,, ambas positivas para *Gammacoronavirus* (Fonte: <<https://www.wikiaves.com.br/>>).

Uma vez que não obtivemos sucesso no isolamento em ovos embrionados e que as análises realizadas no projeto de mestrado (BARBOSA, 2015) foram ineficazes na amplificação do gene S e de outras regiões do ORF1ab mais variáveis, optou-se pela metagenômica, utilizando plataformas de Sequenciamento de Nova Geração. Estas tecnologias não requerem conhecimento prévio da sequência genômica do agente para detectá-lo o que nos era conveniente devido ao baixo número de sequências completas de coronavírus de aves silvestres disponíveis no GenBank e, entre as que há, a variabilidade é muito grande inviabilizando o desenvolvimento de primers para diversas regiões.

Conforme descrito no item 4.7.2, 11 amostras foram novamente extraídas utilizando o volume total de amostra disponível no método de Trizol[®] e coluna com a finalidade de obter a maior concentração de RNA possível, entretanto, apenas 6 amostras (DEP16, PNRJ46, PNRJ49, Mairiporã03, Mairiporã08 e Mairiporã12) apresentaram concentração de material genético suficiente para atingir os requisitos mínimos de detecção da plataforma Ion Torrent S5[™] System.

De acordo com o discutido anteriormente, a carga viral presente neste tipo de amostra é muito baixa e o tempo que ficaram armazenadas foi claramente um fator importante, uma vez que as amostras mais antigas mostraram, em geral, menores concentrações de material genético (item 5.3).

Apesar da baixa concentração inicial, os dados de qualidade de leituras se mostraram satisfatórios e foram submetidos ao software Kraken 2. Este software realiza o alinhamento de cada leitura individualmente com um banco de dados formado a partir das amostras virais disponíveis no GenBank. Nos resultados é possível observar uma grande quantidade de vírus diferentes em coinfeção. A presença de pelo menos um dos vírus conhecidos por causarem imunossupressão em aves tais como Adenovírus, Herpesvírus, Bornavírus e Influenza A foi

observada em todas as amostras sequenciadas. Estas coinfeções podem ter levado à queda de imunidade que levou à infecção pelos CoVs. Foram ainda detectados Flavivírus e Rotavírus, possíveis zoonoses. Esses resultados demandam futuros estudos para montagem e tipagem destes vírus.

Apesar de apenas duas das amostras terem apresentado leituras de CoVs, foi realizada a tentativa de montagem contra genomas de referência (Tabela 8, ítem 5.4.1) em todos os conjuntos de dados. Corroborando com a análise inicial, duas das amostras testadas, DEP16 e PNRJ46 resultaram em contigs.

Novamente, a baixa concentração viral é a provável explicação para o número de resultados. Outro fator limitante são as poucas sequências completas de CoVs de aves silvestres disponíveis no GenBank, uma vez que o Kraken 2 as utiliza como banco de dados.

A sequência da amostra DEP16 gerou um fragmento parcial da região codificante da proteína N entre as posições 26232pb e 26639pb do genoma de referência MK359255. A amostra PNRJ46, por sua vez, gerou um fragmento parcial da região codificante e da região 3'UTR entre 26173pb a 27408pb do genoma de referência MK359255. As duas sequências da região N agruparam-se no mesmo clado, confirmando serem pertencentes aos *Gammacoronavirus*.

A sequência da região 3'UTR gerada pela amostra PNRJ46, por sua vez, mostrou novamente uma correlação próxima com CoVs de aves aquáticas, incluindo uma espécie de frango d'água (*Porphyrio martinica*) e Pinguim-Rei (*Aptenodytes patagonicus*). Esta região é altamente variável entre os gêneros de CoVs, somente permitindo o alinhamento de CoVs semelhantes aos de *Gallus gallus* (antigo vírus da Bronquite Infecciosa) o que permite a inclusão desta amostra neste grupo.

Estas sequências geradas pela montagem pertenciam ao gene N e à região 3'UTR. Uma vez que a replicação dos CoVs envolve a produção de RNAs subgenômicos que englobam o gene a ser traduzido mais todos os genes e sequências que o seguem e as sequências N e 3'UTR são a porção final do genoma, estas são as regiões de maior concentração, o que explicaria serem as únicas a serem adequadamente sequenciadas.

Tanto a região codificadora da região N quanto a região 3'UTR são consideradas regiões moderadamente variáveis. Este fator é uma vantagem pois sequências de regiões excessivamente conservadas podem ser de pouca utilidade na análise filogenética, devido a mutações limitadas. Por outro lado, se a região do genoma viral for altamente variável, a detecção poderá ser dificultada bem como a comparação com outras sequências. De fato, essas regiões já foram sugeridas para tipagem de *Gammacoronavirus* tais como Chen et al. (2013),

que sugeriu o gene codificante proteína N para diagnóstico e análise filogenética em amostras de pato e a região 3'UTR é amplamente utilizada para diferenciação entre vírus semelhantes ao *Gammacoronavírus* de galinhas (CAVANAGH et al., 2001; CALLISON et al., 2006).

Em resumo, os dados obtidos mostram evidências de que aves silvestres podem carrear coronavírus entre diferentes sítios migratórios no Brasil. Estes CoVs pertencem aos grupos *Delta* e *Gammacoronavírus* e estão presentes, em especial nas regiões Sul e Sudeste do país. Outros vírus foram detectados na análise metagenômica, incluindo Influenza A, Rotavírus, Flavivírus, Adenovírus, Herpesvírus e Bornavírus e podem representar potenciais ameaças à saúde humana e animal, requerendo estudos futuros.

Os gêneros *Alpha* e *Betacoronavírus* não foram incluídos por serem muito divergentes das amostras aviárias nesta região. Por se tratar de uma região bastante divergente entre os gêneros, apenas *Gammacoronavírus* foram representados

7 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 voltado à sanidade avícola em nosso país.

REFERÊNCIAS*

ARAUJO 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). 10th 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, LIM, 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. *Virology*. 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 Immun*, 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. *Transboundary Emerging Diseases*. 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? *International Journal of Molecular Sciences*. 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. *Journal of General Virology*. 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. *Journal of General Virology*. 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. *Emerging Infectious Diseases*. 2014;20(1):138-141. DOI: 10.3201/eid2001.130984.

VENKATESH D, POEN MJ, BESTEBROER TM, SCHEUER RD, VUONG O, CHKHAIIDZE 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. *Journal of Virology*. 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 in Genetics*. 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. *Scientific Reports*. 2018;8(1):686. DOI: 10.1038/s41598-018-26851-1.

WOOD DE, SALZBERG SL. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*. 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. *Journal of Virology*. 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 Comittee 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>