

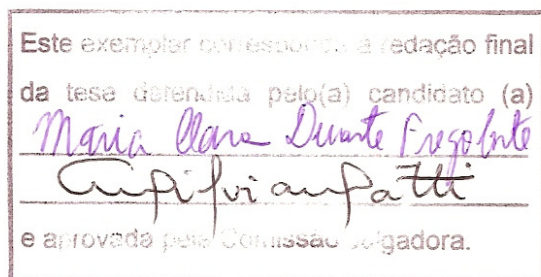
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARIA CLARA DUARTE FREGOLENTE

**“CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE PICOBIRNAVÍRUS
DETECTADOS EM AMOSTRAS FECAIS DE DIFERENTES
HOSPEDEIROS”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti

Campinas, 2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

F881c Fregolente, Maria Clara Duarte
Caracterização genética de picobirnavírus detectados
em amostras fecais de diferentes hospedeiros / Maria Clara
Duarte Fregolente. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Maria Silvia Viccari Gatti.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Picobirnavírus. 2. Hospedeiros naturais. 3.
Quasiespécies. 4. Genogrupo I. I. Gatti, Maria Silvia
Viccari, 1954-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Genetic characterization of picobirnaviruses detected in fecal samples from different hosts.

Palavras-chave em inglês: Picobirnavirus; Natural hosts; Quasispecies; Genogroup I.

Área de concentração: Microbiologia.

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular.

Banca examinadora: Maria Silvia Viccari Gatti, Fabiana Fantinatti-Garbogginni, Rovilson Gilioli, Dolores Ursula Mehnert, Vera de Souza Gouvêa.

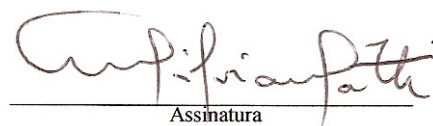
Data da defesa: 16/07/2010.

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular.

Campinas, 16 de julho de 2010.

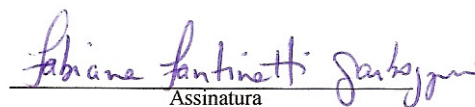
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti (Orientadora)



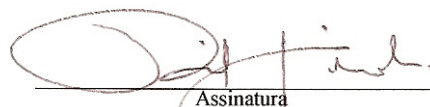
Assinatura

Dra. Fabiana Fantinatti-Garbogginni



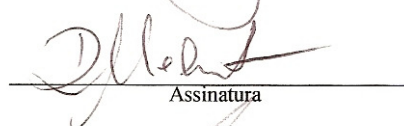
Assinatura

Dr. Rovilson Gilioli



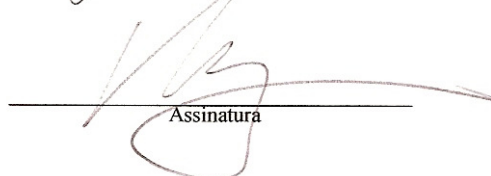
Assinatura

Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert



Assinatura

Profa. Dra. Vera de Souza Gouvêa



Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite

Assinatura

Prof. Dr. José Antonio Jerez

Assinatura

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Assinatura

Dedico esta tese às minhas três famílias:

À Sagrada, que me abençoou durante todo o desenvolvimento deste trabalho;

À minha família, que me formou e me apoiou desde sempre;

E àquela que virei a formar, tendo como exemplo as anteriores.

Pai, mãe, Tê e Rê, amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus o dom da vida e permitir as ferramentas para que eu estude a vida. E as bênçãos e gentilezas diárias. Agradeço à Virgem Maria, a bênção especial.

Agradeço a meu pai, Enio, e a minha mãe, Rita, o amor incondicional e todo apoio às minhas decisões. Seus conselhos e ensinamentos foram fundamentais para minha formação. Procurei sempre aumentar a herança deixada por vocês, a educação.

Agradeço a minha irmã, Maria Teresa, o amor, a amizade, a preocupação, a atenção, o cuidado. Obrigada por chorar junto, por comemorar junto, por aprender junto, enfim, por simplesmente estar junto.

Agradeço ao Renato, pessoa especial, bênção de Deus. Ele esteve presente em todos os momentos difíceis e especiais desde 1999 e é com quem planejo colher todos os frutos que foram plantados. Obrigada por todo carinho, amizade, amor e principalmente paciência. Te amo mais do que ontem e menos do que amanhã, pra sempre!

Agradeço ao Rafael, meu ex-quemsabefuturo-cunhado mais querido, a toda paciência, amizade e companhia.

Agradeço a meus avós as orações, os ensinamentos e o estar junto comigo em todos os momentos, mesmo que distantes: meus avós Enio e Milton (*in memorian*), minhas avós Sylce e Therezinha, e meus avós postiços Maria do Carmo e Dionísio.

Agradeço a todos meus familiares, por sempre comemorarem comigo as minhas conquistas. Agradecimentos especiais a: meus tios e padrinhos Orlando e Eliana; meu tio Edson; minha “mãedinda” Mônica, meus primos e seus agregados Júnior e Jussara, Ana e Carlos, Gustavo e Valéria.

Agradeço a toda a família do Renato, especialmente ao Fábio, a Enide, Taís, Silvio e Mateus, a acolhida e adoção.

A meus amigos e colegas da graduação, eterna Turma Bio-01D, meus agradecimentos especiais. Nosso convívio e nossas eternas discussões filosóficas foram e continuam sendo importantes para meu crescimento. Obrigada por continuarem presentes, mesmo que espalhados por todo o mundo.

As queridas Marina, Josiane e Lílían, amigas de longa data e sempre presentes. Obrigada pelo apoio e por todos os pensamentos positivos.

Aos meus amigos citronélicos, agradeço os momentos de alegria e descontração que foram importantes para que eu conseguisse chegar viva ao final da tese.

Os amigos e colegas do Cursinho Professor Chico Poço. Obrigada pela oportunidade e aprendizado didático. Com certeza a vivência no cursinho me mostrou uma outra face da educação e me permitiu a primeira experiência em sala de aula.

Não tenho como agradecer a Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti, minha eterna orientadora. Com ela aprendi muito mais do que ciência e virologia. Aprendi ética, moral, convivência com as diversidades, humildade, honestidade, paciência, política, futebol, etc. Nossa relação se tornou tão cúmplice que não precisamos terminar a frase para nos fazermos entender. Sairei muito agradecida por todo aprendizado e espero me tornar “gente grande” como você espera. Sentirei saudades....

Agradeço a Unicamp, principalmente o Instituto de Biologia, onde estou desde 2001, e concluí tanto minha graduação quanto minha pós-graduação. Além da formação acadêmica, a Universidade me proporcionou uma formação pessoal ímpar. As experiências pessoais e as amizades formadas estarão eternamente na memória.

Os amigos que fiz no Laboratório de Virologia. Os antigos, mas inesquecíveis: Carolina Marinelli, Erich de Castro, Guilherme Gennari, Guilherme Mendes, Marianna Favaro e Stefanie Jordan. Os recentes: Mariana Bernardo da Rocha, Mariana Mega, Mislene Fantinato e Thabata Caruzo. Os agregados: Geórgio Valadares e Silvia Simi. Todos contribuíram de alguma maneira na elaboração deste trabalho e na minha formação pessoal, afinal, passei oito anos nesse laboratório e estive mais nele do que na minha própria casa.

A querida Sandra Soares Martins, a orientação metodológica e científica e todos os ensinamentos que pacientemente me transmitiu, muitas vezes mais de uma vez. Obrigada pelo senso de ética, organização e metodologia, que foram e serão úteis em todos os aspectos de minha vida.

A Ana Lúcia Rodrigues da Soledade, amiga muito querida, presente todos os dias. Obrigada por sua alegria contagiante e seus cafés cheios de cumplicidade. Obrigada por me ensinar a fazer café e por dividir comigo suas duas gestações.

A Izabel di Fiori, que conheci na graduação e levei ao Laboratório de Virologia. Obrigada pela sua amizade, por me receber em sua casa nas nossas segundas de estudos, pela convivência diária durante seis anos, pela confiança, pelos pensamentos e pelas orações. Mesmo distante sua amizade é muito importante para mim.

A Flávia Ghiraldini e Joelma Vieira. Duas amigas que fiz e que contribuíram muito em várias etapas do desenvolvimento dessa tese.

Agradeço ao Fernando Rosado Spilki e ao Jorge Mondego a ajuda no desenho de iniciadores. Ao Felipe Gomes Naveca, toda ajuda dispensada, mesmo que distante. E ao Gustavo Lacerda Costa a triagem das sequências.

Ao Prof. Dr. Domingos Silva Leite, os ensinamentos e a permissão para utilização do espaço e equipamentos de seu laboratório. Agradeço também a todos os funcionários e alunos: Erivaldo da Silva, Mirtis Ferraz, Cláudia de Moura, Daniela Domingos e Monique Tiba. Aos professores Dr. Tomomassa Yano e Dra. Clarice Weis Arns, a permissão do uso do espaço e equipamentos dos seus laboratórios, e aos seus alunos e funcionários toda a ajuda dispensada.

A Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, a Profa. Dra. Verena Hildegard Gyárfás Wolf e a Kiara Carolina Cardoso, a doação das amostras de fezes. Sem elas esse trabalho não teria nem começado.

Ao Dr. Márcio José da Silva, a grande ajuda nas metodologias de clonagem e sequenciamento e a disponibilização de seu laboratório e sua equipe, Daniela Stancato e Ana.

Agradeço aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação: Profa. Dra. Alda Maria Backx Noronha Madeira, Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert e Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira. Obrigada por todas as críticas e sugestões.

Agradeço aos professores que fizeram parte da minha pré-banca de defesa de tese: Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini e Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão. A discussão foi rica e acrescentou muito na finalização deste trabalho.

Agradeço aos professores que fizeram parte da minha banca de defesa de tese: Profa. Dra. Fabiana Fantinatti-Garboggini, Profa. Dra. Vera Gouvea, Dr. Rovilson Gilioli e Profa. Dra. Dolores Ursula Mehnert.

A Maria de Lourdes Fagundes e Silvia Helena Zeferino Evagelista, secretárias da pós-graduação, toda a ajuda, orientação e zelo para que este trabalho fosse finalizado.

A Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) o financiamento desse trabalho.

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”*

Louis Pasteur.

FREGOLENTE, MCD. Caracterização genética de picobirnavírus detectados em amostras fecais de diferentes hospedeiros. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular, área de Microbiologia) – Universidade Estadual de Campinas.

RESUMO

Picobirnavírus (PBV) pertencem à família Picobirnaviridae, gênero Picobirnavirus e têm como espécie tipo *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus*. Estes pequenos vírus não envelopados, de dois segmentos genômicos de RNA dupla fita, são encontrados em amostras de fezes diarreicas ou não de diferentes hospedeiros mamíferos, incluindo o homem, aves e répteis. Os mecanismos da infecção por PBV e sua associação a gastroenterites ainda não estão esclarecidos, mas são colocados como agentes emergentes e oportunistas e seu potencial zoonótico foi sugerido. As técnicas utilizadas para a identificação desses vírus são: eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) e RT-PCR. A primeira permite diferenciar os PBV pelas diferenças de migração dos seus segmentos genômicos. Já na RT-PCR são sete os pares de iniciadores descritos, incluindo aqueles que permitem sua diferenciação em genogrupo I ou II. Este projeto objetivou caracterizar genética e filogeneticamente PBV de diferentes hospedeiros naturais e as estratégias utilizadas foram o sequenciamento total e parcial dos segmentos genômicos de PBV e a definição de uma região conservada para o desenho de iniciadores capazes de diagnosticar todos os PBV por RT-PCR. Foram analisadas para a presença de PBV amostras de fezes de suínos, coelhos, ratos, cães, cobras, ratos silvestres, capivaras, cavalos e bovinos. Utilizando a EGPA, PBV foram identificados em todos os hospedeiros estudados e pela RT-PCR identificou-se genogrupo I de PBV em quase todos, com exceção de capivaras e bovinos. O genogrupo II não foi identificado. A circulação do genogrupo I em diferentes hospedeiros sugere que não existe especificidade genogrupo-espécie de hospedeiro. O sequenciamento parcial do segmento menor dos PBV identificados em cães, cobra e ratos mostrou uma relativa homologia principalmente com sequências de PBV identificados em humanos. A coexistência de duas ou mais populações de PBV em um mesmo hospedeiro foi identificada em cavalos, suínos, rato, rato silvestre e coelho a partir do sequenciamento parcial do segmento menor após clonagem, sugerindo um possível mecanismo de *reassortment*, o que pode levar a salto entre espécies. Esses resultados suportam o potencial emergente e zoonótico dos PBV. A heterogeneidade nas sequências de nucleotídeos verificada por esse sequenciamento sugere a presença de quasiespécies de PBV nesses hospedeiros. A menor variação observada nas sequências de nucleotídeos de PBV identificados em animais não confinados pode ser justificada pela tendência ao menor contato entre esses animais do que entre os de cativeiro, fazendo com que a transmissão viral também seja menor. Foi proposta uma padronização para a nomenclatura dos PBV, baseada em seu hospedeiro, país e ano de identificação. O atual sistema de classificação para os PBV não é apropriado, devido à identificação de PBV não pertencentes a nenhum dos genogrupos já descritos e à presença de heterogeneidade nas sequências de PBV do genogrupo I. Infelizmente, não foi possível sequenciar o genoma completo dos PBV estudados, não sendo identificada nenhuma sequência conservada que permitisse o desenho de iniciadores capazes de unificar o diagnóstico dos PBV. Estudos tentativos estão em andamento para que, a partir do sequenciamento completo e análise do genoma de diferentes PBV, seja possível definir as porcentagens de identidade mínimas para sua classificação em genogrupos e/ou genotipos.

Palavras-chave: picobirnavírus; genogrupo I; hospedeiros naturais; quasiespécies.

FREGOLENTE, MCD. Genetic characterization of picobirnaviruses detected in fecal samples from different hosts. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular, área de Microbiologia) – Universidade Estadual de Campinas.

ABSTRACT

Picobirnaviruses (PBV) belong to the Picobirnaviridae family, genus Picobirnavirus, and *Human picobirnavirus* and *Rabbit picobirnavirus* are the type species. These small non-enveloped viruses, with two genetic segments of double-stranded RNA, can be found in diarrheic or non-diarrheic fecal samples from different hosts like mammals, including humans, birds and reptiles. PBV infection and its association with gastroenteritis are still unknown, but they are considered opportunistic and emergent pathogens, and their zoonotic potential has also been suggested. Techniques for PBV identification include: polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and RT-PCR. The first one allows characterization of PBV according to the migration pattern of their genomic segments. In the RT-PCR, seven primers' pairs have been designed, including one that allows classification of PBV into genogroups I or II. The aim of this project was the genetic and phylogenetic characterization of PBV identified in fecal samples from different natural hosts by complete and partial sequencing of PBV genomic segments and set up of a conserved region for designing primers able to detect all PBV by RT-PCR. Fecal samples from pigs, rabbits, rats, dogs, snakes, wild rats, capybaras, horses and cattle were analyzed for PBV occurrence. PBV were identified in all studied hosts by PAGE and genogroup I was identified in the majority of them by RT-PCR, except in capybaras and cattle. Genogroup II was not identified. Genogroup I circulation in different hosts suggests that there is no genogroup-host species' specificity. Partial sequencing of small PBV's genomic segment identified in fecal samples from dogs, snake and rats showed homology mainly to human PBV sequences. Coexistence of two or more PBV population in the same host could be determined in fecal samples from horses, pigs, rat, wild rat and rabbit by partial sequencing of small PBV's genomic segment after cloning, suggesting that reassortment may occur in nature, allowing host species jump. These results support the emergent and zoonotic potential of PBV. The heterogeneity found in PBV's nucleotide sequences after cloning suggests the existence of PBV quasispecies in these hosts. The little variation in nucleotide sequences of PBV identified in hosts living in an open environment could be justified by a tendency of less contact among these animals, allowing less viral spread. The classification system used nowadays is cannot be considered appropriated as it doesn't consider the heterogeneity found in PBV's genogroup I sequences. Also, PBV that don't belong to any of the described genogroups, remain with no classification. Therefore, a new standard nomenclature for PBV, based on its host, country and year of identification was proposed. Unfortunately, it was not possible to sequence the complete genome of PBV found in this study. Also, no conserved sequence could be identified for primers' design, which would be capable of standardized PBV detection. Additional studies are ongoing to try to define nucleotide sequences identity percentages for genogroups and/or genotypes classification.

Key-words: picobirnavirus; genogroup I; natural hosts; quasispecies.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO GERAL.....	13
3 ESTRATÉGIAS.....	13
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
5 RESULTADOS.....	28
6 DISCUSSÃO.....	45
7 CONCLUSÕES.....	55
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO I – Aceite Comitê de Biossegurança IB-UNICAMP.....	64
ANEXO II – Artigos publicados.....	65

1 INTRODUÇÃO

Vírus de dois segmentos genômicos encontrados ao acaso em fezes de crianças foram denominados picobirnavírus (PBV). Seu diâmetro de 30 a 35 nm lhe rendeu o prefixo pico, de pequeno. Já seu genoma, constituído por dois segmentos de RNA dupla fita (*double-stranded RNA* - dsRNA), foi responsável pelo birna do nome (PEREIRA et al., 1988a). PBV possuem densidade de 1,38 a 1,40 g/mL em gradiente de cloreto de cério e os segmentos genômicos apresentam dois tipos de perfis eletroforéticos, denominados longo e curto, de acordo com o padrão de migração em eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). O perfil curto tem o maior segmento com 1,75 kpb e o menor com 1,55 kpb e foi identificado juntamente com oocistos de *Cryptosporidium parvum* em amostras de fezes de humanos, sugerindo a associação do vírus a este parasita (GALLIMORE et al., 1995a). Para o perfil longo, os tamanhos estimados dos segmentos maior e menor dos PBV são de 2,3 a 2,6 kpb e de 1,5 a 1,9 kpb, respectivamente (GATTI et al., 1989).

Atualmente, estes vírus são classificados pelo ICTV (*International Committee of Taxonomy of Virus*) como membros da família *Picobirnaviridae*, gênero *Picobirnavirus*, e têm como espécies tipo: *Human picobirnavirus* e *Rabbit picobirnavirus*.

Após serem detectados em fezes de crianças (PEREIRA et al., 1988a), estes vírus foram também encontrados em fezes de diferentes hospedeiros animais, principalmente mamíferos, como ratos (PEREIRA et al., 1988b, FREGOLENTE et al., 2009), hamsters (PEREIRA et al., 1989), bovinos (VANOPDENBOSCH & WELLEMANS, 1989; BUZINARO et al., 2003; GHOSH et al., 2009), suínos (GATTI et al., 1989; LUDERT et al., 1991; PONGSUWANNA et al., 1996; BÁNYAI et al., 2008; CARRUYO et al., 2008), cavalos (BROWNING et al., 1991), coelhos (GALLIMORE et al., 1993; LUDERT et al., 1995), tamanduá bandeira (HAGA et al.,

1999), cães (COSTA et al., 2004, FREGOLENTE et al., 2009), macacos (WANG et al., 2007) jumento, orangotango e tatu (MASACHESSI et al., 2007). Em aves foram detectados PBV em galinhas (LEITE et al., 1990), gansos (MASACHESSI et al., 2007), nandu-de-darwin, ema, pelicano e faisão (MASACHESSI et al., 2007) e, em répteis, esses vírus foram encontrados em diferentes espécies de cobra (FREGOLENTE et al., 2009).

Até o momento não se comprovou que PBV estejam associados a casos de gastroenterites. GATTI e colaboradores (1989) demonstraram diferenças significativas na detecção dos vírus em fezes diarreicas e não diarreicas de suínos. Por outro lado, LUDERT e colaboradores (1991) não confirmaram esses achados. Em humanos os PBV têm sido identificados em porcentagens menores que 10%, associados ou não a quadros de diarreia (GROHMANN et al., 1993; GALLIMORE et al., 1995b; CASCIO et al., 1996; ROSEN et al., 2000; BÁNYAI et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2006; GANESH et al., 2010). Em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é sugerida a associação entre PBV e diarreia (GROHMANN et al., 1993; CUNLIFFE & GLASS, 1996; GONZÁLEZ et al., 1998; GIORDANO et al., 1999; ROSEN et al., 2000; MARTÍNEZ et al., 2003).

BHATTACHARYA e colaboradores (2007), em estudo com crianças não portadoras do HIV, detectaram PBV em 3,57% das amostras de fezes diarreicas e em 1,48% das não diarreicas, sugerindo também a associação dos PBV com diarreia. Apenas uma das amostras de fezes apresentou PBV de perfil longo e as análises estatísticas mostraram significativa associação entre PBV de perfil curto e diarreia nas crianças afetadas.

GIORDANO e colaboradores (2008) realizaram um estudo retroativo de 26 anos (1977 – 2002) a partir da análise de géis de poliacrilamida desidratados mantidos na coleção do laboratório. Nesse estudo, PBV de perfil longo foram encontrados em apenas duas das 2224

amostras fecais analisadas, referentes a crianças com diarreia, sendo que em uma das amostras de fezes havia também a presença dos onze segmentos genômicos típicos de rotavírus. Os autores sugerem que PBV de perfil longo devem ser considerados mais como patógenos oportunistas do que como agentes etiológicos associados à diarreia em crianças.

Atualmente, PBV são tidos como patógenos emergentes e oportunistas em casos de diarreia, principalmente em indivíduos imunocompromissados. Recentemente, foi sugerido o potencial zoonótico destes vírus após comparação de sequências de nucleotídeos de PBV identificados em humanos e em animais (GANESH et al., 2010).

Em estudos no nosso laboratório foram observadas descamações discretas no ápice das vilosidades do jejuno de ratos infectados experimentalmente com PBV, mostrando que os enterócitos são células permissivas à sua multiplicação. Os animais inoculados também excretaram os vírus nas fezes, que não eram diarreicas. Portanto, PBV podem causar a infecção sem levar a sinais e sintomas de diarreia, pelo menos nesse modelo animal (FREITAS, 2003). MASACHESSI e colaboradores (2007), em seu estudo com animais mantidos em cativeiro, também observaram a ausência de sintomas e sugerem que a infecção por PBV seja do tipo persistente, já que dois dos animais analisados excretaram o vírus por até sete meses consecutivos. A hipótese de re-infecção nesses animais pôde ser descartada já que eles não tiveram contato com outros animais e foram supridos por água e alimentos individualmente.

HAGA e colaboradores (1999), os primeiros a detectar PBV em animais mantidos em cativeiro, também observaram a eliminação dos vírus pelas fezes por um período de quatro meses, o que sugere infecção do tipo crônica ou persistente. Relações de virulência, patogenicidade e possíveis hospedeiros para esses vírus necessitam de novos estudos, incluindo-se aí a busca de modelos experimentais, que definam pelo potencial patogênico do PBV.

Pelo fato dos PBV serem liberados em baixas concentrações nas fezes dos animais infectados, dificultando assim sua purificação, além de sua não adaptação em sistemas celulares *in vitro*, testes imunodiagnósticos para sua detecção e/ou caracterização não estão disponíveis. Porém, após a obtenção de VLPs (*virion-like particles*) de PBV *in vitro* por DUQUERROY e colaboradores (2009) estes testes se tornam passíveis de desenvolvimento. Um dos testes utilizados para a sua detecção, a EGPA, permite a visualização do dsRNA viral. Nesse teste a variação no perfil eletroforético, ou seja, na migração dos dois segmentos virais, sugere a existência de heterogeneidade no genoma viral, que poderá ou não ser importante para as relações espécie-hospedeiros ou de antigenicidade, ou mesmo de patogenicidade (BHATTACHARYA et al., 2007).

A reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) também é utilizada para o diagnóstico de PBV diretamente das fezes de seus hospedeiros ou a partir de amostras de água de esgoto (ROSEN et al., 2000; BÁNYAI et al., 2003; WAKUDA et al., 2005; BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007; BÁNYAI et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009; SYMONDS et al., 2009; GANESH et al., 2010; VAN LEEUWEN et al., 2010).

Estudos relativos aos segmentos genômicos do PBV buscam definir por suas sequências de nucleotídeos e seus produtos. O primeiro foi feito em coelhos, quando GREEN e colaboradores (1999) sequenciaram o genoma do segmento maior dos PBV o que revelou três regiões de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORFs). As sequências de aminoácidos deduziram para valores de peso molecular dos polipeptídios de 65,8, 6,0 e 11,9 kDa para as ORFs 1, 2 e 3, respectivamente. A comparação da estrutura primária destas proteínas com a da RNA polimerase dependente de RNA (RPDR) não concluiu por homologia, o que sugere que o

segmento maior do PBV é o responsável pela codificação de suas proteínas estruturais. Os valores obtidos por GREEN e colaboradores (1999) estão próximos àqueles descritos por GATTI (1994), que utilizou a EGPA-SDS para a determinação dos pesos moleculares das proteínas de vírus purificados. Posteriormente, ROSEN e colaboradores (2000) descreveram a sequência parcial do segmento maior e a sequência total do segmento menor de vírus identificados em fezes de humanos. Análises das sequências do segmento menor revelaram três domínios característicos de genes que codificam RPDR para vírus de RNA fita simples e fita dupla. Após este estudo, outros pesquisadores também sequenciaram uma porção do segmento menor do PBV encontrado em fezes de humanos e animais, confirmando ser esse segmento o responsável pela codificação da RPDR (BÁNYAI et al., 2003 e 2008; BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007; CARRUYO et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009; GANESH et al., 2010; VAN LEEUWEN et al., 2010). Sendo assim, no segmento maior estão as ORFs responsáveis pela codificação das proteínas estruturais do PBV.

WAKUDA e colaboradores (2005) determinaram a sequência completa dos dois segmentos de PBV identificados em uma amostra de fezes diarreica de uma criança tailandesa e GHOSH e colaboradores (2009) determinaram a sequência completa do segmento menor de PBV identificado em uma amostra de fezes diarreica de um bezerro na Índia. Recentemente, foram definidas as sequências totais dos dois segmentos de PBV identificados em amostras de fezes de humanos na Holanda (VAN LEEUWEN et al., 2010).

A discussão sobre a quantidade de ORFs codificadas pelo segmento maior teve início com GREEN e colaboradores (1999) que definiram por três: uma maior, que codificaria uma proteína de 591 aminoácidos, e outras duas menores, que codificariam proteínas de 212 a 532 e de 51 a 215 aminoácidos. Já ROSEN e colaboradores (2000) e WAKUDA e colaboradores (2005)

definiram apenas duas ORFs associadas ao segmento maior de PBV e a comparação entre as sequências obtidas por estes estudos demonstrou identidade de 49,7%. Apesar do sequenciamento completo dos segmentos genômicos do PBV ter sido feito por WAKUDA e colaboradores (2005), esses não determinaram por motivos de aminoácidos que sugiram funções para as proteínas codificadas pelas ORFs 1 e 2. Esses mesmos autores buscaram a expressão *in vitro* das proteínas traduzidas pelas ORFs e detectaram uma proteína de 25 kDa, correspondente à ORF 1 do segmento maior. A proteína esperada de 62 kDa, que deveria ser sintetizada pela ORF 2, não foi encontrada. Concluíram, então, que o códon de iniciação da ORF 2 poderia ser fraco no sistema de expressão utilizado. Atualmente, considera-se apenas duas ORFs associadas ao segmento maior de PBV, sendo que a ORF 2 apresenta seu códon de iniciação sobreposto à sequência final da ORF 1. Assim, o início da leitura da segunda região deve-se dar por reiniciação traducional, como ocorre em norovírus (NAPTHINE et al., 2009), ou pelo mecanismo de mudança de *frame* de leitura ribossomal, como em HIV-1 (PARKIN et al., 1992).

Já para o segmento menor, apenas uma ORF foi identificada em todos os estudos que determinaram a sequência parcial ou total deste segmento (ROSEN et al., 2000; BÁNYAI et al., 2003; WAKUDA et al., 2005; GHOSH et al., 2009) e as sequências das regiões 3' e 5' do segmento menor de PBV de bezerro (GHOSH et al., 2009) e de humanos (ROSEN et al., 2000; WAKUDA et al., 2005) são conservadas.

Em estudo utilizando o sistema de expressão em baculovírus, DUQUERROY e colaboradores (2009) obtiveram a formação de VLPs (*virion-like particles*) de PBV *in vitro*, permitindo assim a elucidação da estrutura desses vírus. Os autores utilizaram o cDNA da ORF2 do segmento maior de PBV identificado em coelho (GREEN et al., 1999) e verificaram a formação de uma proteína de 55 kDa e outra de 7 kDa. Pela análise por espectrometria de massas

foi possível concluir que a proteína menor (7 kDa) é resultado de uma modificação pós-traducional que gera a proteína do capsídeo viral (55 kDa). A proteína menor só está presente quando os segmentos genômicos estão contidos no virion, sugerindo um papel no empacotamento do genoma durante a montagem das partículas virais. As VLPs apresentam estrutura icosaédrica formada por 120 subunidades agrupadas em 60 dímeros simétricos. Esta é uma estrutura única, não encontrada em nenhum outro vírus icosaédrico descrito até o momento, mostrando que os PBV não estão relacionados aos birnavírus. Além disso, estas VLPs apresentam diâmetro e morfologia idênticos àqueles reportados por LUDERT e colaboradores (1991) para virions intactos de PBV de suínos.

A comparação das VLPs de PBV com outros vírus de dsRNA ou RNA simples fita (*single-stranded RNA* - ssRNA) demonstrou que existe uma forte similaridade na organização entre PBV e partitivírus. Coincidentemente, partitivírus infectam fungos e plantas e foram os únicos vírus caracterizados a infectar *Cryptosporidium parvum*. PBV considerados atípicos, por apresentarem o perfil curto de migração em EGPA, foram identificados em amostras de fezes de humanos juntamente com oocistos de *C. parvum* (GALLIMORE et al., 1995a). Assim, sugere-se uma investigação na estrutura destes PBV atípicos e uma comparação destes com partitivírus para verificar a possibilidade de PBV terem atravessado a barreira de espécies a partir de organismos eucariotos unicelulares para infectar vertebrados (DUQUERROY et al., 2009).

A utilização da técnica de RT-PCR por ROSEN e colaboradores (2000) permitiu avanços no estudo das relações filogenéticas entre PBV identificados em diferentes hospedeiros. Os pares de iniciadores desenhados a partir do segmento menor de PBV identificados em humanos determinaram por pelo menos dois genogrupos diferentes. O par de iniciadores PicoB25 e PicoB43, proveniente da amostra chinesa 1-CHN-97, detectou PBV em amostras fecais coletadas

de humanos e animais em sete países de quatro continentes (ROSEN et al., 2000; BÁNYAI et al., 2003 e 2008; WAKUDA et al., 2005; BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009) além da detecção de PBV a partir de amostras ambientais de esgoto nos Estados Unidos (SYMONDS et al., 2009). Já o par de iniciadores PicoB23 e PicoB24, obtido a partir da amostra 4-GA-91, fornecida por um portador de HIV, reagiu com vírus provenientes de fezes do mesmo indivíduo que liberou PBV por vários meses (ROSEN et al., 2000). Além destas, reagiu também com PBV identificados em amostras de fezes diarreicas de humanos na Índia (BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007) e na Holanda (VAN LEEUWEN et al., 2010). Apesar de terem sido amplificadas por este par de iniciadores, as análises das sequências de nucleotídeos mostram que estas não apresentam significativa homologia e que, em alguns casos, são divergentes entre si. Estes grupos foram denominados de genogrupo I (PicoB25 e PicoB43) e genogrupo II (PicoB23 e PicoB24) por BÁNYAI e colaboradores (2003) quando identificaram três PBV pertencentes ao genogrupo I em fezes de humanos, sendo que apenas duas delas eram próximas entre si.

Uma importante contribuição de BHATTACHARYA e colaboradores (2006 e 2007) foi a sugestão de que existe uma relação entre PBV de perfil curto e casos de diarreia e que apenas PBV de perfil curto são amplificados com o par de iniciadores do genogrupo II.

O sequenciamento da porção amplificada pelos iniciadores referentes ao genogrupo I de PBV foi realizado por outros grupos analisando PBV de diferentes hospedeiros (BÁNYAI et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GHOSH et al., 2009; VAN LEEUWEN et al., 2010) e identificados em amostras de esgoto (SYMONDS et al., 2009). Com amostras fecais de suínos, BÁNYAI e colaboradores (2008) obtiveram 13 amplificados referentes ao genogrupo I de PBV que foram clonados e sequenciados. A análise filogenética incluiu 43 sequências nucleotídicas de

PBV de suínos e 17 de humanos de diferentes países, obtidas do *GenBank*, sendo apenas uma delas do genogrupo II. A similaridade dos PBV de suínos e de humanos para genogrupo I ficou entre 50,6% e 89,9%, enquanto entre PBV de suínos variou de 54,5% a 100%. Estes valores estão de acordo com aqueles encontrados quando são comparadas apenas sequências nucleotídicas do genogrupo I de PBV de humanos. A árvore filogenética resultante mostra que, em geral, PBV de suínos têm relativa identidade, o que sugere que PBV poderiam ser facilmente transmitidos entre hospedeiros de mesma espécie. Apenas uma sequência nucleotídica de PBV de suíno foi mais próxima a uma de PBV de humano. Esta foi a primeira análise filogenética que incluiu sequências de nucleotídeos de PBV de outros hospedeiro, além de sequências de PBV humanos. As análises anteriores se referem apenas a este hospedeiro (ROSEN et al., 2000; WAKUDA et al., 2005; BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007).

A sequência do segmento menor de PBV identificados em bezerro foi comparada às sequências deste segmento disponíveis no *GenBank* e demonstrou ser mais próxima daquelas de PBV de suínos do que de PBV de outros hospedeiros. Apesar da sequência nucleotídica de PBV de bovino estar próxima às sequências de nucleotídeos de PBV de suínos na árvore filogenética, a identidade de nucleotídeos entre aquela e sequências de nucleotídeos de PBV de humanos e de suínos variou entre 51,2-64,9% e 53,5-64,1%, respectivamente. Já entre o PBV identificado em bezerro a identidade de nucleotídeos foi de 57,3-59,4%, 52-60,6% e 55,3%, quando comparada com sequências de PBV de cães, ratos e cobra, respectivamente (GHOSH et al., 2009).

Variações significativas entre sequências de nucleotídeos de PBV foram também identificadas na recente análise molecular de amostras de fezes diarreicas de humanos. Além de definir a sequência total dos dois segmentos genômicos de um dos PBV identificados, os autores do estudo definiram outras sequências parciais do genogrupo I de PBV, divergentes entre si,

encontrando-se em ramos separados da árvore filogenética inferida. Obtiveram também, apenas um PBV pertencente ao genogrupo II, corroborando com outros estudos que mostraram baixa identificação deste genogrupo (VAN LEEUWEN et al., 2010).

A fim de analisar especificamente amostras de fezes de suínos, CARRUYO e colaboradores (2008) basearam-se em sequências de nucleotídeos de PBV de humano e coelho disponíveis no *GenBank* para desenhar novos iniciadores degenerados, tanto para o segmento maior quanto para o segmento menor de PBV. Testando os iniciadores contra amostras de fezes de suínos positivas para PBV em EGPA, os autores obtiveram cinco clones a partir de amplificadores do segmento menor, sendo que todos os clones apresentaram sequências nucleotídicas diferentes entre si, exceto para dois deles que foram 100% idênticos. A partir das sequências de nucleotídeos obtidas foram desenhados iniciadores específicos e 60% das amostras de PBV identificados em suínos testadas frente a estes iniciadores apresentaram-se positivas em RT-PCR enquanto apenas 20% das mesmas foram positivas em EGPA. Com esses resultados, sugere-se que haja mais de um genogrupo de PBV de suíno circulando na Argentina. Ainda, para que seja possível a detecção de PBV por técnicas moleculares será necessário o uso de uma combinação de iniciadores capazes de abranger os diferentes genogrupos.

O entendimento da evolução molecular de uma dada população é alvo de estudos para epidemiologistas e biólogos evolucionistas. Para isso, vírus de RNA têm se tornado uma importante ferramenta devido a características como complexidade limitada do genoma (com relação ao número de proteínas codificadas), alta mutabilidade e rápida taxa de replicação (DOMINGO & HOLLAND, 1997). Estas características permitem uma elevada taxa de evolução dos vírus de RNA, que, quando associado às mudanças no ambiente, são os principais agentes de doenças emergentes. Um dos estudos da dinâmica dos sistemas de evolução primitivos em vírus

de RNA resultou no conceito de quasispécie, introduzido por EIGEN e SCHUSTER (1977) e descrito por MOYA e colaboradores (2004) como um fenômeno onde o alvo da seleção natural não é a linhagem do replicador mais rápido e sim um amplo espectro de mutantes que foi gerado por cópias errôneas do mais adaptado. Assim, estudos moleculares com vírus de RNA podem determinar por quasispécies presentes em determinado hospedeiro. Por também ser um vírus de RNA, todas as características acima citadas estão presentes nos PBV. A investigação sobre a possibilidade da existência dos PBV como quasispécie foi iniciada (BÁNYAI et al., 2008), mas necessita de mais estudos que concluam por esta denominação. Até o momento, o que pode ser inferido é que para PBV existem variantes genômicas de acordo com a sequência do gene da RPDR, localizado no segmento menor desses vírus.

Para vírus segmentados existe a possibilidade da ocorrência do fenômeno de *reassortment* quando dois vírus diferentes co-infectam a mesma célula hospedeira. No caso de uma co-infecção, no momento da montagem de novas partículas virais, pode-se ter a montagem de partículas que incluam segmentos pertencentes a cada um dos tipos que estava infectando aquela célula, gerando um terceiro vírus diferente dos originais. A ocorrência do *reassortment* em vírus está muitas vezes associada à emergência viral e/ou ao salto entre espécies de hospedeiros. Por serem vírus segmentados, PBV estão sujeitos à ocorrência deste mecanismo.

Com cada vez mais surtos e infecções virais emergentes e com sinais indiretos indicando que PBV podem provocar sinais clínicos, pelo menos em pacientes imunocompromissados, torna-se importante obter o máximo de conhecimento possível para todos os vírus que estão presentes nos ambientes humanos (DUQUERROY et al., 2009). Uma ferramenta atual capaz de explorar a diversidade em agentes microbianos de uma determinada comunidade é a análise metagenômica. Três estudos utilizando este tipo de análise foram capazes de identificar PBV em

fezes de indivíduos sem diarreia (ZHANG et al., 2006), de crianças com diarreia (FINKBEINER et al., 2008) e de crianças com paralisia flácida aguda (VICTORIA et al., 2009). Em crianças com diarreia, três sequências de nucleotídeos de PBV foram identificadas em duas das doze amostras fecais avaliadas. Porém, apenas duas destas três sequências apresentaram homologia significativa com sequências de nucleotídeos de PBV disponíveis no *GenBank* (FINKBEINER et al., 2008).

Mesmo não utilizando análise metagenômica, um estudo recente propôs a detecção de vírus de eucariotos em águas residuárias nos Estados Unidos. Neste caso, PBV do genogrupo I foram detectados em 100% das amostras de esgoto bruto e em 33% das amostras de efluente final analisadas, demonstrando que podem ser utilizados como indicadores dos processos de descontaminação de esgoto (SYMONDS et al., 2009).

Fica evidente a importância do contínuo estudo de vírus de RNA quando analisamos a grande variação genética apresentada e a possibilidade de emergência e zoonose. Dentro deste contexto estão os PBV, vírus que necessitam de novos estudos que tragam informações moleculares adicionais que, não só definam pelas relações vírus-hospedeiros e as relações evolutivas entre diferentes PBV isolados de diferentes hospedeiros, como permitam sua efetiva identificação e classificação. A análise dos vários trabalhos da literatura mostra que as informações relativas a esses vírus, tanto em seus aspectos epidemiológicos quanto moleculares estão em crescente avanço. Também fica evidente que os pesquisadores estão buscando ampliar a gama de hospedeiros analisados e as ferramentas de identificação para que uma comparação mais precisa dos PBV seja obtida. A efetiva classificação desses vírus será possível com o sequenciamento total de PBV encontrados em diferentes hospedeiros.

2 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar genética e filogeneticamente picobirnavírus de diferentes hospedeiros naturais pelo sequenciamento de seus segmentos genômicos.

3 ESTRATÉGIAS

- Sequenciar o genoma completo de picobirnavírus identificados em diferentes hospedeiros.
- Sequenciar o genoma parcial de picobirnavírus identificados em diferentes hospedeiros
- Definir por uma região conservada para o desenho de iniciadores capazes de diagnosticar todos os picobirnavírus.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de fezes

Foram analisadas amostras de fezes dos seguintes hospedeiros: bovinos, cães, capivaras, cavalos, cobras, coelhos, ratos, ratos silvestres e suínos.

As amostras de fezes de bovinos (*Bos taurus*) (n = 72) foram obtidas de animais de criação de fazendas da região de Campinas entre os anos de 2004 e 2008. Do total, apenas três apresentaram-se diarreicas.

Os cães (*Cannis familiaris*) que forneceram as amostras de fezes entre os anos de 2003 e 2007 eram animais de companhia ou de canis da região de Campinas. As amostras (n = 349) foram doadas pela Profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biologia da Unicamp, e pela Profa. Dra. Verena Hildegard Gyárfás Wolf, da Faculdade de Jaguariúna. Do total, 21 delas eram diarreicas.

As amostras de fezes de capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*) (n = 18) e rato silvestre (*Oryzomys* sp.) (n = 54) foram doadas pela Profa. Dra. Silmara M. Allegretti entre os anos de 2005 e 2007 e são originárias de animais de vida livre. Nenhuma das amostras fecais era diarreica. A professora também doou as amostras de fezes coletadas de cavalos (*Equus caballus*) mantidos por criadores da região de Campinas. Dentre o total de 132 amostras fecais, apenas cinco eram diarreicas e foram coletadas entre os anos de 2005 e 2009.

As cobras que forneceram as amostras de fezes entre os anos de 2006 e 2009 eram animais de cativeiro de diferentes espécies. As amostras foram doadas pela Profa. Dra. Silmara M. Allegretti e pela doutoranda Kiara Carolina Cardoso da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Do total de 82 amostras de fezes, nenhuma era diarreica.

A coleta das amostras de fezes de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) ocorreu durante o ano de 2004 de animais mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia, da Unicamp. No total foram coletadas 167 amostras de fezes e nenhuma delas era diarreica.

As amostras de fezes de ratos (*Rattus norvegicus*) (n = 56) foram coletadas entre os anos de 2003 e 2009. Uma dessas amostras foi obtida de um animal que apresentava diarreia e era mantido no biotério do Centro Multidisciplinar Para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. As demais foram obtidas de animais mantidos no biotério do Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biologia, da Unicamp.

Já as amostras de fezes de suínos (*Sus domesticus*) (n = 37) fazem parte da coleção de amostras do Laboratório de Virologia, do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biologia, da Unicamp. Elas foram obtidas de animais de criação de diferentes granjas da região de Campinas entre os anos de 1997 e 2004 e 15 delas eram diarreicas.

Para todas as 967 amostras fecais foi preparada uma suspensão fecal a 10% em tampão fosfato salina (PBS) 0,01 M pH 7,4, após centrifugação a 2.000 rpm por 10 minutos (Rotor JA-14, centrífuga JA21-Beckmann). As amostras de fezes e suspensões foram armazenadas a 4° C durante todo o período.

4.2 Extração do RNA viral para EGPA

A extração do dsRNA viral foi realizada segundo HERRING e colaboradores (1982) com modificações. Partindo de 500 µL da suspensão fecal, foram adicionados 50 µL de solução de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% e seguiu-se com a incubação a 37° C por 30 minutos. Foram então acrescentados 500 µL de fenol-clorofórmio (v/v) e a suspensão foi agitada em Vortex por 1 a 2 minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm (centrífuga 5804R, Eppendorf, rotor F45-30-11) por 10 minutos, a fase aquosa foi removida e a ela foram adicionados 50 µL de NaCl a 20% e 1.000 µL de etanol a 4° C. A reação foi incubada a -20° C por 18 horas e então se seguiu com a centrifugação a 12.800 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 20 µL de mistura dissociante. O extrato foi armazenado a -20° C até o momento da EGPA ou aplicado diretamente no gel de poliacrilamida. Antes da eletroforese os extratos foram incubados a 56° C por 15 minutos e então foram aplicados em um gel de poliacrilamida a 7,5% (HERRING et al., 1982). A impregnação do gel por prata foi feita segundo SAMMONS e colaboradores (1981).

Todas as centrifugações foram realizadas a 4° C e amostras de rotavírus de símio do grupo A (SA-11) cultivada em células MA104 ou CaCo-2 foram utilizadas como controle positivo da reação e marcador de peso molecular para a EGPA.

4.3 Extração do RNA viral com TRIzol[®] para RT-PCR

Para a caracterização dos genogrupos I e II de PBV pela RT-PCR específica para cada genogrupo, o dsRNA foi extraído pelo reagente *TRIzol*[®] (Invitrogen) de acordo com as orientações do fabricante.

A extração se iniciou com 300 µL de suspensão fecal aos quais foram adicionados 900 µL de *TRIzol*[®], sendo então homogeneizado e incubado à temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. Adicionou-se 240 µL de clorofórmio e a solução foi agitada vigorosamente por 15 segundos e incubada a TA por 2 minutos. Após centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a fase superior aquosa foi transferida para outro tubo e a ela foram adicionados 700 µL de álcool isopropílico (Merck). A solução foi mantida a TA por 10 minutos e depois foi centrifugada a 12.300 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido com cautela e ao precipitado foram adicionados 900 µL de etanol 75% a 4° C. Após agitação em Vortex por 1 minuto, seguiu-se com nova centrifugação a 9.700 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o tubo foi seco por 10 minutos. O RNA extraído e precipitado foi ressuspenso em 30 µL de água deionizada estéril tratada com 1% de dietilpiricarbonato (DEPC) e estocado a -20° C até o momento do uso.

Todas as centrifugações foram realizadas a 4° C em centrífuga 5804R, Eppendorf, com o rotor F45-30-11.

4.4 RT-PCR para genogrupo I e II

Foram analisadas por esta metodologia todas as amostras de fezes positivas para PBV em EGPA. O protocolo de RT-PCR foi realizado de acordo com o método descrito por ROSEN e colaboradores (2000), com modificações.

A denaturação do dsRNA se deu a 94° C por 5 minutos em uma solução contendo 2 pmol de cada iniciador, 7% de dimetil sulfóxido (DMSO–Riedel-deHaën) e 10 µL de RNA extraído e aquecido a 55° C por 10 minutos. Após essa etapa seguiu-se com a adição do tampão da enzima [50 mM Tris-HCl (pH 8,3 a temperatura ambiente); 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂], 10 mM de ditionitrotol (DTT-Invitrogen), 20 µM de cada nucleotídeo trifosfatado (dNTP *mix*-Invitrogen) e 100 U por reação da enzima MMLV-RT (Invitrogen). A reação de transcrição reversa teve volume final de 25 µL e foi incubada a 37° C por 50 minutos com uma etapa final de 70° C por 15 minutos para a denaturação da enzima.

A reação em cadeia da polimerase foi feita com 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), utilizando-se o tampão da enzima [75 mM Tris-HCl, (pH 8,8 a 25° C); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0,1% Tween 20], 50 µM de mistura de dNTPs, 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 5 pmol de cada iniciador. O volume final da reação de PCR foi de 50 µL. A denaturação inicial foi feita a 94° C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de amplificação, sendo a denaturação a 94° C por 1 minuto, a temperatura de anelamento de 52° C para o conjunto PicoB25/PicoB43 e de 49° C para o conjunto PicoB23/PicoB24 por 1 minuto, e a extensão a 72° C por 1 minuto. A extensão final foi feita a 72° C por 7 minutos.

Em todas as reações de RT-PCR para genogrupo I e II de PBV foi utilizada água tratada com DEPC a 1% como solvente e controle negativo e os pares de iniciadores conforme consta abaixo no quadro 1.

Quadro 1. Sequências dos iniciadores para a caracterização de genogrupos de PBV por RT-PCR, desenhados a partir de vírus identificados em fezes de humanos (ROSEN et al., 2000).

Identificação dos iniciadores	Posição (nucleotídeo)	Sequência (5'-3')	Genogrupo
PicoB25	665-679	TGG TGT GGA TGT TTC	I
PicoB43	850-865	A(GA)T G(CT)T GGT CGA ACT T	
PicoB23	685-699	CGG TAT GGA TGT TTC	II
PicoB24	1039-1053	AAG CGA GCC CAT GTA	

4.5 Extração do RNA viral para as reações de amplificação completa

O uso do reagente *TRIzol*[®] para a extração de RNA não é específica para dsRNA. Assim, algumas modificações foram propostas a fim de selecionar este tipo específico de ácido nucléico. Todas as centrifugações desta etapa foram realizadas a 4° C em centrífuga 5804R, Eppendorf, com o rotor F45-30-11.

Foram pesadas 100 mg de fezes dissolvidas em PBS e foram adicionados 1.000 µL de *TRIzol*[®]. Os tubos foram incubados a 65° C por 10 minutos com agitação a cada minuto. Adicionou-se 500 µL de clorofórmio, agitou-se por mais um minuto e seguiu-se com a centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido em um tubo novo e mais 600 µL de clorofórmio foram adicionados. As etapas de agitação, centrifugação e recolhimento do sobrenadante foram repetidas e adicionou-se igual volume de álcool isopropílico. Uma nova centrifugação foi feita a 12.800 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e ao precipitado foram adicionados 90 µL de tampão EB (*MinElute Gel Extraction Kit* – Qiagen). Os tubos foram mantidos por 30 minutos a TA, com agitação leve até a ressuspensão do precipitado. Foram adicionados 30 µL de cloreto de lítio 8 M (LiCl) e os tubos foram mantidos a 4° C por 18 horas.

Passado o tempo de incubação refrigerada, seguiu-se com a centrifugação a 14.000 rpm por 30 minutos. Após essas etapas, o dsRNA se manteve no sobrenadante enquanto o ssRNA foi precipitado. A purificação passou a ser feita pelo uso do *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen). O sobrenadante foi então recolhido em tubo novo e a ele foram adicionados 120 µL de álcool isopropílico. A solução foi aplicada em coluna e fez-se uma centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto. O filtrado foi descartado, a coluna foi repostada e 500 µL de tampão QG foram adicionados. Repetiram-se as etapas de centrifugação, descarte do filtrado e recolocação da coluna e adicionaram-se 750 µL de tampão PE. Após período de incubação a TA por 5 minutos, repetiu-se a centrifugação e descarte do filtrado, por duas vezes, e a coluna foi posta em um tubo novo. Foram adicionados 10 µL de água tratada com DEPC ou tampão EB e após incubação a TA por 1 minuto, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 1 minuto. O dsRNA extraído foi mantido a -20° C até o momento do uso.

4.6 Reação de amplificação completa segundo WAKUDA e colaboradores (2005), com modificações

4.6.1 Reação de ligação e purificação

Nesta primeira etapa, foram utilizados o oligonucleotídeo A, fosforilado na sua porção 5' e bloqueado com um grupamento amina em sua porção 3', (Quadro 2) e a enzima T4 RNA ligase (Promega), que promove a ligação do oligonucleotídeo apenas na porção 3' do RNA dupla fita extraído. Essa reação utilizou 10 U da enzima T4 RNA ligase (Promega), tampão da enzima [50 mM Tris (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 5 mM DDT e 1 mM ATP], 40 U do inibidor de RNase *RNAasin*[®] *Ribonuclease Inhibitor* (Promega), 20 µL de solução de polietileno glicol (PEG) a 40% e 100 ng do oligonucleotídeo A. A reação foi incubada a 37° C por 30 minutos.

O excesso de oligonucleotídeos não ligados e de ssRNA foram removidos por coluna *Microcon 100* (Millipore), de acordo com as instruções do fabricante.

Quadro 2. Sequências do oligonucleotídeo de ligação e dos iniciadores para a RT-PCR do genoma completo de PBV identificados em diferentes hospedeiros (WAKUDA et al., 2005).

Identificação dos iniciadores	Sequências (5'-3')
Oligonucleotídeo A	PO ₄ - CCCTCGAGTACTAACTAGTTAACTGATCACCTCTAGACCTTT- NH ₂
Iniciador B	AAAGGTCTAGAGGTGATCAGTTAACTAGTTAGTACTCGAGGG
Iniciador C	GAGTACTAACTAGTTAACTGATCACCTCTAGACC
Iniciador D	AAAGGTCTAGAGGTGATCAGTTAACT

4.6.2 Reação de transcrição reversa

A transcrição reversa contou com: a) denaturação do dsRNA ligado ao oligonucleotídeo A, que aconteceu em três etapas de aquecimento, 3 minutos a 97° C, 10 minutos a 70° C e 5 minutos a 60° C; b) anelamento do iniciador B (Quadro 2) ao oligonucleotídeo A (são complementares) e c) transcrição reversa com a enzima *MMLV-RT* (Invitrogen). Esta última reação aconteceu por 50 minutos a 37° C e foi composta por: 1,6 mM de solução de dNTP (Invitrogen), 5 mM de DTT (Invitrogen), 80 U de inibidor de *RNAse RNAsin® Ribonuclease Inhibitor* (Promega), 40 pmol do iniciador B, 100 U da enzima *MMLV-RT* (Invitrogen) e 8% de DMSO para um volume final de 25 µL de reação.

4.6.3 Reação em cadeia da polimerase

A reação de PCR foi feita em duas etapas. A primeira utilizou o iniciador C e a segunda o iniciador D (Quadro 2). Ambas foram preparadas nas mesmas concentrações de reagente

descritas no item 3.4. Para a segunda reação, uma alíquota de 2 µL da primeira reação foi adicionada e o volume final de 50 µL foi atingido com água tratada com DEPC.

4.7 Reação de amplificação completa segundo YANG e colaboradores (2004), com modificações

4.7.1 Reação de ligação e digestão

Nesta primeira etapa, foram utilizados o oligonucleotídeo Rota-1, fosforilado na sua porção 5' e bloqueado com um grupamento amina em sua porção 3', (Quadro 3) e a enzima T4 RNA ligase (Promega). Essa reação utilizou 10 U da enzima T4 RNA ligase (Promega), tampão da enzima [50 mM Tris (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 5 mM DDT e 1 mM ATP], 40 U do inibidor de RNase *RNasin*[®] *Ribonuclease Inhibitor* (Promega), 10 µL de solução de PEG a 40% e 200 ng do oligonucleotídeo Rota-1. A reação foi incubada a 16° C por 18 horas.

O excesso de reagentes não consumidos durante a reação foram digeridos por ação de 8 µL do agente *ExoSAP-IT*[®] (USB Corporation), incubado a 37° C por 15 minutos.

Quadro 3. Sequências do oligonucleotídeo de ligação e dos iniciadores para a RT-PCR do genoma completo de PBV identificados em diferentes hospedeiros (YANG et al., 2004).

Identificação dos iniciadores	Sequências (5'-3')
Oligonucleotídeo Rota-1	PO ₄ -CCCGTCGACGAATTCTTT-NH ₂
Iniciador Rota-2	AAAGAATTCGTCGACGGG

4.7.2 Precipitação

Para precipitar o dsRNA ligado ao oligonucleotídeo Rota-1, 4,8 µL de solução de NaCl a 20% e 96 µL de etanol 100% foram adicionados ao tubo de reação. Após período a -20° C por 18

horas, uma centrifugação (5804R, Eppendorf, rotor F45-30-11) a 12.800 rpm a 4° C foi realizada e o sobrenadante eliminado. O precipitado foi ressuspensão em diferentes volumes de água tratada com DPEC.

4.7.3 Reação de transcrição reversa e digestão

A transcrição reversa contou com: a) denaturação do RNA dupla fita ligado ao oligonucleotídeo Rota-1, que aconteceu com uma etapa de aquecimento de 5 minutos a 90° C; b) anelamento do iniciador Rota-2 (Quadro 3) ao oligonucleotídeo Rota-1 (são complementares) e c) transcrição reversa com a enzima *SuperScript™ III* (Invitrogen). Esta última reação aconteceu em duas temperaturas: 25° C por 5 minutos e 55° C por 60 minutos. A reação foi composta por: 0,5 mM de solução de dNTP (Invitrogen), 5 mM de DTT (Invitrogen), 40 U de inibidor de RNase *RNasin® Ribonuclease Inhibitor* (Promega), 2 pmol do iniciador Rota-2, 200 U da enzima *SuperScript™ III* (Invitrogen) e 7% de DMSO para um volume final de 20 µL de reação.

Para a digestão do RNA do híbrido RNA/cDNA, 2 U da enzima Ribonuclease H (Fermentas) foram adicionadas ao tubo após a reação de transcrição reversa. A reação foi mantida por 20 minutos a 37° C.

4.7.4 Reação em cadeia da polimerase

A PCR foi feita com a enzima *Platinum® Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), utilizando-se o tampão da enzima diluído 10 vezes, 0,5 mM de mistura de dNTPs, 1,0 mM de sulfato de magnésio (MgSO₄) e 20 pmol do iniciador Rota-2. O volume final da reação foi de 50 µL. A ciclagem se iniciou com duas etapas de pré-PCR, uma a 94° C por 5 minutos e outra a 68° C por 10 minutos. Seguiram-se então 30 ciclos de amplificação, sendo a denaturação feita a 94° C por 1

minuto, o anelamento a 50° C por 1 minuto e a extensão a 72° C por 3 minutos. A extensão final foi feita a 68° C por 7 minutos.

Como controle negativo das reações foi utilizada água tratada com DEPC.

4.8 Reação de amplificação completa segundo POTGIETER e colaboradores (2009), com modificações

4.8.1 Reação de ligação e purificação

Nesta primeira etapa, foram utilizados o oligonucleotídeo PC3-T7loop, fosforilado na sua porção 5' e hidroxilado em sua porção 3', (Quadro 4) e a enzima T4 RNA ligase (Promega e Fermentas). Essa reação utilizou 30 U da enzima T4 RNA ligase, tampão da enzima, 8 mM de MgCl₂, 0,01% de BSA, 1 mM de ATP, 6 µL de solução de PEG a 40% e 200 ng do oligonucleotídeo PC3-T7loop. A quantidade de dsRNA adicionada para a reação variou entre 0,4 e 200 ng. A quantificação foi feita através de leitura por espectrofotometria em equipamento específico *GeneQuant RNA/DNA Calculator* (Pharmacia Biotech - mod. 80.2103-98). A reação foi incubada a 37° C por 16 horas.

Para a purificação foi utilizado o kit de purificação *MinElute Gel Extraction Kit* (Qiagen) segundo a orientação do fabricante para purificação de DNA.

Quadro 4. Sequências do oligonucleotídeo de ligação e dos iniciadores para a RT-PCR do genoma completo de PBV identificados em diferentes hospedeiros (POTGIETER et al., 2009).

Identificação dos iniciadores	Sequências (5'-3')
Oligonucleotídeo PC3-T7loop	PO ₄ -GGATCCCGGGAATTCGGTAATACGA CTCACTATATTTTATAGTGAGTCGTATTA-OH
Iniciador PC2	CCGAATTCCCGGGATCC

4.8.2 Reação de transcrição reversa

A transcrição reversa contou com: a) denaturação do dsRNA ligado ao oligonucleotídeo PC3-T7loop, que aconteceu na presença de 15% de DMSO a uma temperatura de 95° C por 5 minutos e b) transcrição reversa com a enzima *M-MLV RT* (Invitrogen). Esta última reação aconteceu a 37° C por 50 minutos. A reação foi composta por: tampão da enzima, 7 mM de MgCl₂, 1 mM de solução de dNTP (Invitrogen), 5 mM de DTT (Invitrogen), 200 U por reação da enzima *M-MLV RT* (Invitrogen), em um volume final de 20 µL de reação.

4.8.3 Remoção do excesso de RNA e anelamento do cDNA

Após a síntese de cDNA a remoção do excesso de RNA foi feita pela adição de 0,1 M de NaOH e incubação a 65° C por 30 minutos em termociclador. Antes de iniciar o anelamento do cDNA, 0,1 M de Tris-HCl (pH 7,5) e 0,1 M de HCl foram adicionados. O anelamento ocorreu durante incubação a 65° C por uma hora.

4.8.4 Reação em cadeia da polimerase

A amplificação do cDNA foi feita com a enzima Taq DNA Polimerase (Fermentas), utilizando-se o tampão da enzima, 1 mM de mistura de dNTPs, 1 mM de MgCl₂ e 20 pmol do iniciador PC2. O volume final da reação foi de 50 µL. A ciclagem se iniciou com duas etapas de pré-PCR, uma a 72° C por 1 minuto e outra a 94° C por 2 minutos. Seguiram-se então 30 ciclos de amplificação, sendo a denaturação feita a 94° C por 1 minuto, o anelamento feito a diferentes temperaturas por 1 minuto e a extensão a 72° C por 3 minutos. A extensão final ocorreu a 72° C por 5 minutos.

4.9 RT-PCR com sobreposição de sequências para os dois segmentos de PBV

Dado a não obtenção dos segmentos completos de PBV a partir de uma única amplificação uma alternativa testada foi a amplificação parcial desses segmentos virais. Para isso, novos iniciadores foram desenhados por nós, com a colaboração de Fernando Rosado Spilki e Jorge Mondego, baseando-se nas sequências de nucleotídeos de PBV de humanos disponíveis no *GenBank*. Assim, para o segmento maior foram desenhados os iniciadores PBV2.1 ao PBV2.8, conforme consta no Quadro 5. As posições dos iniciadores foram definidas de maneira a permitir a sobreposição de sequências. Já para o segmento menor, os iniciadores PBV1.1 ao PBV1.4 foram desenhados a fim de que os iniciadores para genogrupo I fossem utilizados em conjunto. Assim, PicoB25 foi usado em reação de RT-PCR com PBV1.1 e em reação de *semi-nested* PCR com PBV1.2. Da mesma maneira, PicoB43 foi usado com PBV1.3 e PBV1.4.

Quadro 5. Sequências e características dos oligonucleotídeos utilizados para a RT-PCR com sobreposição de sequências de PBV identificados em diferentes hospedeiros.

Identificação dos oligonucleotídeos	Sequências (5'-3')	Sentido	Posição inicial no genoma (nucleotídeo)	Segmento
PBV1.1	GCAGTTGGGACTGT	Reverso	30	Menor
PBV1.2	ATCCTCCGCAGATA	Reverso	416	
PBV1.3	GAAAGGAGTTTAATAGTTTA	Direto	1196	
PBV1.4	CAAAGGCTATTAGCGC	Direto	1732	
PBV2.1	GGCAGCCGACACACTAAC	Direto	96	Maior
PBV2.2	TGGCTCGATCCGCACTTG	Reverso	682	
PBV2.3	ATCGATACGTGCCACCAA	Direto	510	
PBV2.4	ACACACATCACACCAGGA	Reverso	1129	
PBV2.5	GTTGCAAGCGCTACTGAGTG	Direto	1061	
PBV2.6	GAGGGGATCGTATGTGGG	Reverso	1826	
PBV2.7	GGTTAAACTGCTGGCTGTTG	Direto	1769	
PBV2.8	CAGAGTTTCACCCGTAAGGA	Reverso	2420	

Para estas reações o dsRNA foi extraído por *TRIzol*[®] (Invitrogen) como já descrito no item 3.3. As reações de RT-PCR foram feitas segundo a mesma descrição para as reações do item 3.4 exceto pelas temperaturas de anelamento dos iniciadores.

A reação para o segmento menor contou com um *semi-nested* PCR que foi feito da seguinte maneira: 2 µL do resultado da PCR foram adicionados ao volume da solução de *nested*, sendo o volume final de 50 µL. As concentrações dos reagentes foram as mesmas da reação de PCR.

Em todas as reações foi utilizada água tratada com DEPC como solvente e controle negativo e os pares de iniciadores já descritos acima (Quadro 5).

4.10 Eletroforese em gel de agarose

Todos os resultados de RT-PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, visualizado em transluminador-UV após impregnação em solução de brometo de etídio a 0,5 µg/mL.

4.11 Clonagem em vetor de sequenciamento

Os amplificadores selecionados para a clonagem são aqueles que não puderam ser sequenciados diretamente a partir do resultado da RT-PCR para genogrupo I de PBV. Esses amplificadores correspondem às amostras: PBV/horse/BRA-01/2006 e PBV/horse/BRA-02/2009, de cavalos, PBV/pig/BRA-01/1998 e PBV/pig/BRA-02/1999, de suíno, PBV/rat/BRA-04/2006 de rato, PBV/wild rat/BRA-01/2006, de rato silvestre, e PBV/rabbit/BRA-01/2004, de coelho. Para a clonagem, o vetor *pGEM*[®]-*T Easy* (Promega) foi utilizado, seguindo as orientações do fabricante e com células competentes de *Escherichia coli* da linhagem JM109. Antes de iniciar os

protocolos de clonagem, os amplificados foram purificados com o uso do reagente *ExoSAP-IT*[®] (USB Corporation), também seguindo orientação do fabricante.

4.12 Sequenciamento

Esta etapa foi desenvolvida no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética da Unicamp sob os cuidados do Dr. Márcio José da Silva.

A reação de PCR para o sequenciamento foi feita com o *kit Big Dye* (Applied Biosystems), sendo 0,5 µL de *Big Dye*, 4 µL de tampão, 5 pmol do iniciador, 1 µL de cDNA e água para completar o volume para 20 µL. A ciclagem da reação se iniciou com uma etapa de denaturação a 96° C por 90 segundos seguida de 25 ciclos de 12 segundos a 96° C, 6 segundos a 50° C e 4 minutos a 60° C. O sequenciador automático utilizado foi o modelo *3700 DNA Analyser* (Applied Biosystems).

Para o sequenciamento direto dos produtos da RT-PCR para genogrupo I de PBV foi feita tanto a leitura direta quanto a reversa utilizando os iniciadores PicoB25 ou PicoB43 na reação de sequenciamento. Os PBV selecionados para esta etapa foram: rat/BR-01/BRA/2006, rat/BR-02/BRA/2006 e rat/BR-03/BRA/2006 de ratos, dog/BR-01/BRA/2004 e dog/BR-02/BRA/2004 de cães, e snake/BR-01/BRA/2006 de cobra.

Já para o sequenciamento após clonagem em vetor, os PBV selecionados estão descritos no item 3.11. Foi realizada apenas a leitura direta com o iniciador M13 do vetor e pelo menos 24 clones de cada PBV foram selecionados para o sequenciamento.

4.13 Análise das sequências de nucleotídeos e análises filogenéticas

As sequências de nucleotídeos obtidas após o procedimento de clonagem foram inicialmente triadas com a colaboração de Gustavo Lacerda Costa, do Laboratório de Genômica e Expressão, do Instituto de Biologia da Unicamp. Foram eliminadas das sequências de interesse aquelas de baixa qualidade de leitura e os nucleotídeos referentes ao vetor de sequenciamento.

As sequências obtidas tanto pelo sequenciamento direto quanto pelo sequenciamento pós-clonagem foram comparadas com outras já existentes no banco de dados *GenBank* através das ferramentas *Blastn* e *Blastx*. O alinhamento das sequências foi feito pelo programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (7.0.9.0) e as análises filogenéticas foram realizadas através do programa *MEGA* (4.0.2).

5 RESULTADOS

De um total de 967 amostras de fezes testadas em EGPA, PBV foram detectados em 63 delas (6,51%), distribuídos entre os hospedeiros conforme mostra a tabela 1. Todas as amostras fecais positivas em EGPA foram submetidas à RT-PCR utilizando o par de iniciadores PicoB25 e PicoB43 (genogrupo I). Das 63 amostras de fezes positivas em EGPA, 29 resultaram em amplificadas de 201pb, esperado para o genogrupo I. As outras 34 foram testadas em nova RT-PCR com os iniciadores PicoB23 e PicoB24 (genogrupo II), mas geraram apenas amplificadas inespecíficos.

Tabela 1. Identificação de PBV por EGPA e por RT-PCR em amostras de fezes de diferentes hospedeiros.

Hospedeiro	Número de amostras de fezes positivas em EGPA/Total de amostras analisadas	Porcentagem de identificação por EGPA	EGPA positivas*	
			RT-PCR positivas para genogrupo I	RT-PCR negativas
Bovino	2/72	2,77%	0	2
Cão	3/349	0,86%	2	1
Capivara	1/18	5,55%	0	1
Cavalo	5/132	3,78%	2	3
Cobra	7/82	8,54%	2	5
Coelho	12/167	7,20%	10	2
Rato	14/56	25%	7	7
Rato Silvestre	3/54	5,55%	2	1
Suíno	•16/37	43,24%	♦4	12
Total	63/967	6,51%	29	34

*Somente as amostras de fezes EGPA positivas foram testadas em RT-PCR e esta reação foi feita para genogrupo I de PBV segundo ROSEN e colaboradores (2000).

• Seis amostras diarreicas

♦ Três amostras diarreicas

Apesar da porcentagem total de identificação de PBV por EGPA (6,51%) ser baixa entre os hospedeiros analisados, dois se destacam pela elevada taxa de identificação, são eles os ratos (25%) e os suínos (43,24%). Ainda, apresentamos a primeira detecção de PBV em cobras e capivara. As amostras de fezes de cobra positivas para PBV em EGPA podem ser observadas na figura 1.

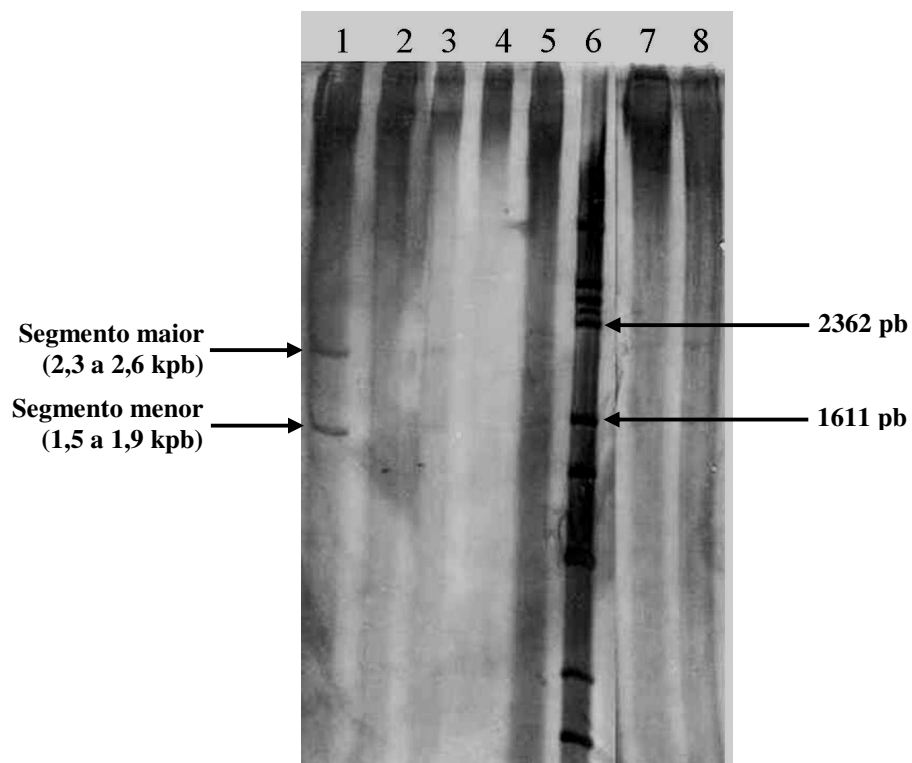


Figura 1. Resultado da EGPA para amostras de fezes de cobras. Coluna 1-5, 7 e 8: perfil longo de dsRNA de PBV; Coluna 6: dsRNA padrão de rotavírus SA-11.

Anteriormente a esse estudo havia apenas uma descrição para genogrupo I de PBV em animais que não humanos (BÁNYAI et al., 2008). Aqui apresentamos a primeira detecção de genogrupo I de PBV em cães, cavalos, cobras, coelhos, ratos e ratos silvestres. Na figura 2 é possível a visualização do resultado da RT-PCR para genogrupo I de PBV para amostras de fezes de diferentes hospedeiros.

Com relação ao sequenciamento total dos dois segmentos genômicos do PBV, as metodologias aplicadas durante o período não se mostraram eficientes. As modificações propostas por WAKUDA e colaboradores (2005) nos protocolos preconizados por LAMBDEN e

colaboradores (1992), apesar de terem sido descritos especificamente para PBV, não se adequaram às nossas amostras. Foram testadas também outras modificações propostas por YANG e colaboradores (2004) e POTGIETER e colaboradores (2009), bem como alterações comunicadas pessoalmente por NAVECA, F.

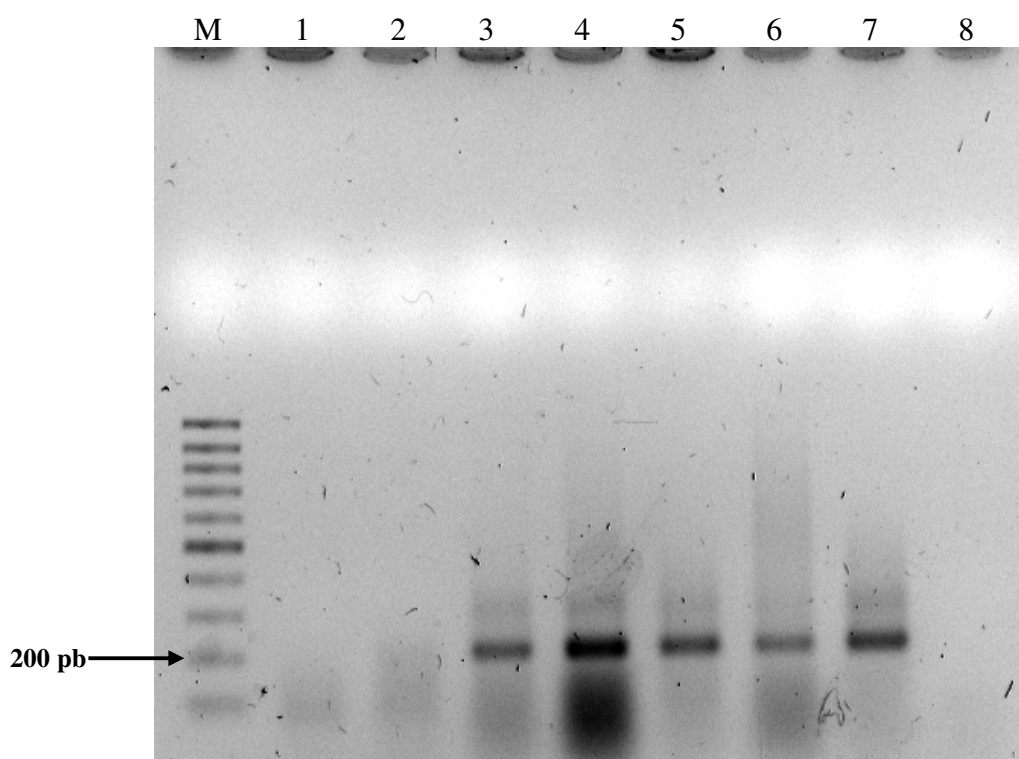


Figura 2. Resultado da RT-PCR para genogrupo I de PBV. M: Padrão de peso molecular (100 pb); colunas 3-7: amostras de fezes positivas para PBV (201 pb); coluna 8: controle negativo. Colunas 3 e 4: amostras de fezes de ratos; coluna 5: amostra de fezes de coelho; coluna 6: amostra de fezes de rato silvestre; coluna 7: amostra de fezes de suíno.

Na tentativa de obter os dois segmentos genômicos de PBV amplificados completamente em uma única reação, as primeiras alterações nos protocolos foram relacionadas à concentração e presença dos diferentes reagentes em cada etapa proposta.

Na reação de ligação foram alteradas: concentração do oligonucleotídeo de ligação; concentração e presença do reagente PEG; quantidade de dsRNA extraído e temperatura e tempo de reação; enzima T4 RNA ligase de diferentes fabricantes.

A purificação com diferentes colunas também foi alterada e eliminada em alguns testes. Para concentrar o resultado da reação de ligação e manter apenas o dsRNA ligado ao oligonucleotídeo nas etapas seguintes, foi testada também uma precipitação com NaCl 20% e etanol 100%. A digestão dos reagentes não utilizados pelo reagente *ExoSAP-IT*[®] (USB Corporation), foi testada antes de iniciar a precipitação.

Já para as reações de RT-PCR as modificações foram mais diversificadas. Foram testadas diferentes concentrações dos iniciadores; diferentes concentrações de DMSO, dNTP e DTT; presença do inibidor de RNase; diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores; e diferentes ciclagens para as reações de PCR. Além disso, testou-se o uso da enzima *SuperScript*[™] *III* (Invitrogen) para a transcrição reversa e da *Platinum*[®] *Pfx* (Invitrogen) para a amplificação. Também foi testada uma etapa de digestão com Ribonuclease H (Fermentas) após o término da transcrição reversa.

Dado a não obtenção dos segmentos completos de PBV a partir de uma única amplificação, uma alternativa apresentada foi a amplificação parcial desses segmentos virais. Para isso, novos iniciadores foram desenhados por nós, baseando-se nas sequências de nucleotídeos de PBV de humanos disponíveis no *GenBank*. Amostras de PBV, provenientes de diferentes hospedeiros, positivas para estes vírus em EGPA e RT-PCR para genogrupo I, foram testadas frente aos novos conjuntos de iniciadores.

Essa outra tentativa gerou amplificadores inespecíficos para apenas uma das amostras testadas. Esse amplificado foi enviado para sequenciamento direto, porém não foi obtida

nenhuma sequência de nucleotídeos definitiva, já que em diferentes pontos houve problemas na leitura. Nem mesmo a clonagem deste fragmento pôde elucidar o problema no sequenciamento.

Após a não obtenção das sequências totais dos segmentos genômicos do PBV, iniciamos o sequenciamento parcial do segmento menor de PBV identificados em diferentes hospedeiros. Assim, seguimos com a obtenção de sequências referentes à porção do gene da RPDR que é amplificada pela RT-PCR para genogrupo I. Para isso, o resultado da reação foi levado diretamente ao sequenciamento, sem clonagem, com o uso dos iniciadores PicoB25 e PicoB43. Essa parte do estudo resultou em um artigo publicado no periódico *Virus Research* sob o título: *Molecular characterization of picobirnavirus from new hosts* (FREGOLENTE et al., 2009) (em anexo).

Nesse estudo, 13 dos 29 amplificados obtidos foram sequenciados, porém apenas seis apresentaram resultados que puderam ser analisados. Para as outras sete amostras os resultados não foram conclusivos. A análise visual dos cromatogramas sugeriu a co-existência de amplificados heterogêneos, como o observado por BÁNYAI e colaboradores (2008). Esses autores solucionaram o problema do sequenciamento ambíguo com a clonagem dos amplificados e escolha aleatória de variantes clonadas para novo sequenciamento. Esta estratégia levou a melhores resultados e foi empregada por nós na tentativa de elucidar mais sequências parciais de nucleotídeos de PBV identificados em diferentes hospedeiros. Os resultados referentes a ela serão descritos a seguir.

As seis sequências de nucleotídeos obtidas foram submetidas ao *GenBank* e podem ser encontradas pelos seguintes números de acesso: EU814970, EU814971, EU814972, EU814973, FJ164031 e FJ164032. Esses PBV foram identificados em três hospedeiros: rato (3), cobra (1) e cão (2); e as sequências de todos eles apresentaram homologia com sequências do segmento

menor de PBV identificados em humanos e suínos. A análise da matriz de identidade de nucleotídeos demonstrou que a amostra rat/BR-01/BRA/2006 apresentou 77% de identidade com a amostra rat/BR-02/BRA/2006 e 92% de identidade com a amostra rat/BR-03/BRA/2006. As amostras rat/BR-02/BRA/2006 e rat/BR-03/BRA/2006 foram 77% idênticas. Como esperado, essas três amostras de PBV de ratos estão num mesmo grupo taxonômico na árvore filogenética (Figura 3). Ainda analisando a matriz de identidade, snake/BR-01/BRA/2006 apresentou 73% de identidade com a amostra de PBV de rato rat/BR-02/BRA/2006, o que representa o maior valor de identidade obtido entre PBV de diferentes hospedeiros. A análise filogenética (Figura 3) mostrou que na maioria dos grupos são mais próximos os PBV que infectam o mesmo hospedeiro. As seis amostras de PBV apresentadas neste estudo estão mais próximas a PBV de humanos do que de suínos, como também foi observado com a comparação entre as sequências de nucleotídeos depositadas no *GenBank*. As amostras de cães foram 41% idênticas e a amostra dog/BR-01/BRA/2004 foi a mais diversa sequência de nucleotídeo obtida, estando mais próxima ao grupo externo do que às sequências de nucleotídeos referentes ao genogrupo I. O oposto foi verificado para a amostra dog/BR-02/BRA/2004, que foi proximamente relacionada com a amostra padrão para genogrupo I de PBV 1-CHN-97, com 69% de identidade.

Este trabalho apresenta a primeira obtenção de sequências de nucleotídeos de PBV de cobra, cães e ratos.

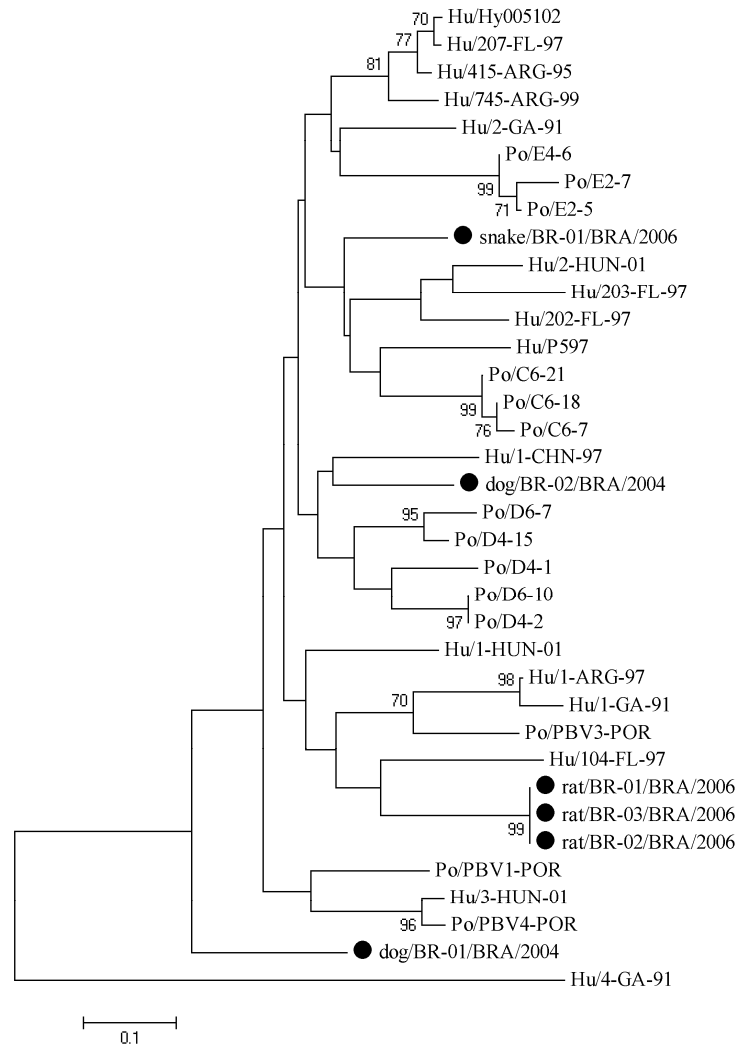


Figura 3. Relações filogenéticas entre amostras de genogrupo I de PBV baseadas em suas sequências de nucleotídeos. Amostras de PBV de humanos e suínos são indicadas pelos prefixos “Hu” e “Po”, respectivamente. As sequências obtidas nesse estudo são indicadas por ●. A amostra 4-GA-91 (genogrupo II) foi usada como grupo externo. A árvore foi inferida pelo programa *MEGA* utilizando o método de *Neighbor-Joining* com as distâncias evolutivas calculadas pelo método de Kimura 2. Valores de *bootstrap* acima de 70% são indicados. As barras representam unidades de substituição por nucleotídeo.

Ainda em relação ao sequenciamento parcial dos segmentos genômicos de PBV, outros resultados foram obtidos após clonagem dos amplificadores de PBV do genogrupo I e posterior sequenciamento. Para cada um dos sete PBV clonados, pelo menos 24 clones foram selecionados para o sequenciamento. Porém, o número de sequências finais foi menor, já que elas foram triadas pela qualidade de leitura. No total, foram 103 sequências obtidas, mas apenas 90 foram analisadas (Tabela 2), pois para as análises foram retiradas as sequências que apresentavam 100% de identidade de nucleotídeo. Cada sequência obtida a partir de um clone foi considerada como uma variante genômica possível dentro de cada PBV. Assim, cada um desses genomas foi denominado por uma letra maiúscula ao final do nome da amostra. Comparando-se as sequências de nucleotídeos dos genomas de um mesmo PBV, a partir da análise da matriz de identidade, observamos que as amostras PBV/horse/BRA-01/2006 e PBV/horse/BRA-02/2009 foram as que apresentaram maior variação da identidade, aproximadamente 90 pontos percentuais cada uma, e a amostra PBV/wildrat/BRA-01/2006 apresentou menor variação (59,7 – 99,5%) (Tabela 2).

Mutações podem ser identificadas em todas as variantes genômicas, mas na maioria dos casos ocorrem mutações de ponto ao longo da sequência sem que haja um local preferencial. Além disso, essas mutações não alteram o domínio característico da RPDR (D-T/S-D).

Tabela 2. Número de sequências submetidas, número de acesso no *GenBank*, número de sequências analisadas e porcentagem de identidade entre as sequências de cada genogrupo I de PBV examinados. Os valores de identidade foram obtidos pela análise da matriz de identidade de nucleotídeos para cada amostra.

Amostra	Número de sequências submetidas	Números de acesso	Número de sequências analisadas	Variação da identidade (%)
PBV/horse/BRA-01/2006	6	GU230476 - GU230481	6	6,1 – 97
PBV/horse/BRA-02/2009	27	GU230482 - GU230508	27	9,4 – 99,5
PBV/pig/BRA-01/1998	17	GU230509 - GU230525	10	21,4 – 99,5
PBV/pig/BRA-02/1999	23	GU230526 - GU230548	16	17,7 – 99,5
PBV/rat/BRA-04/2006	18	GU230565 - GU230582	14	21,1 – 99,5
PBV/wildrat/BRA-01/2006	17	GU230583 - GU230599	11	59,7 – 99,5
PBV/rabbit/BRA-01/2004	16	GU230549 - GU230564	13	19,6 – 99,5
Total	124	---	97	---

Todas as variantes genômicas obtidas a partir da amostra PBV/horse/BRA-01/2006 foram analisadas. A sequência consenso para esta amostra mostrou-se 76% idêntica à amostra referência para genogrupo I de PBV 1-CHN-97 e esta proximidade pôde ser confirmada na árvore filogenética (Figura 4). Uma extensa deleção, a partir do nucleotídeo 32 até o 155, pode ser identificada na variante genômica PBV/horse/BRA-01/2006/B. Essa mutação não altera o domínio característico da RPDR, mas pode prejudicar o funcionamento dessa enzima. Na árvore filogenética, essa variante genômica está mais próxima à amostra do grupo externo 4-GA-91 do que de outras sequências de nucleotídeos de PBV do genogrupo I.

Vinte e sete variantes genômicas foram obtidas e analisadas a partir da outra amostra de genogrupo I de PBV de cavalo, PBV/horse/BRA-02/2009, e a inserção de um nucleotídeo foi identificada em uma das variantes genômicas dessa amostra. Caso essa inserção não seja

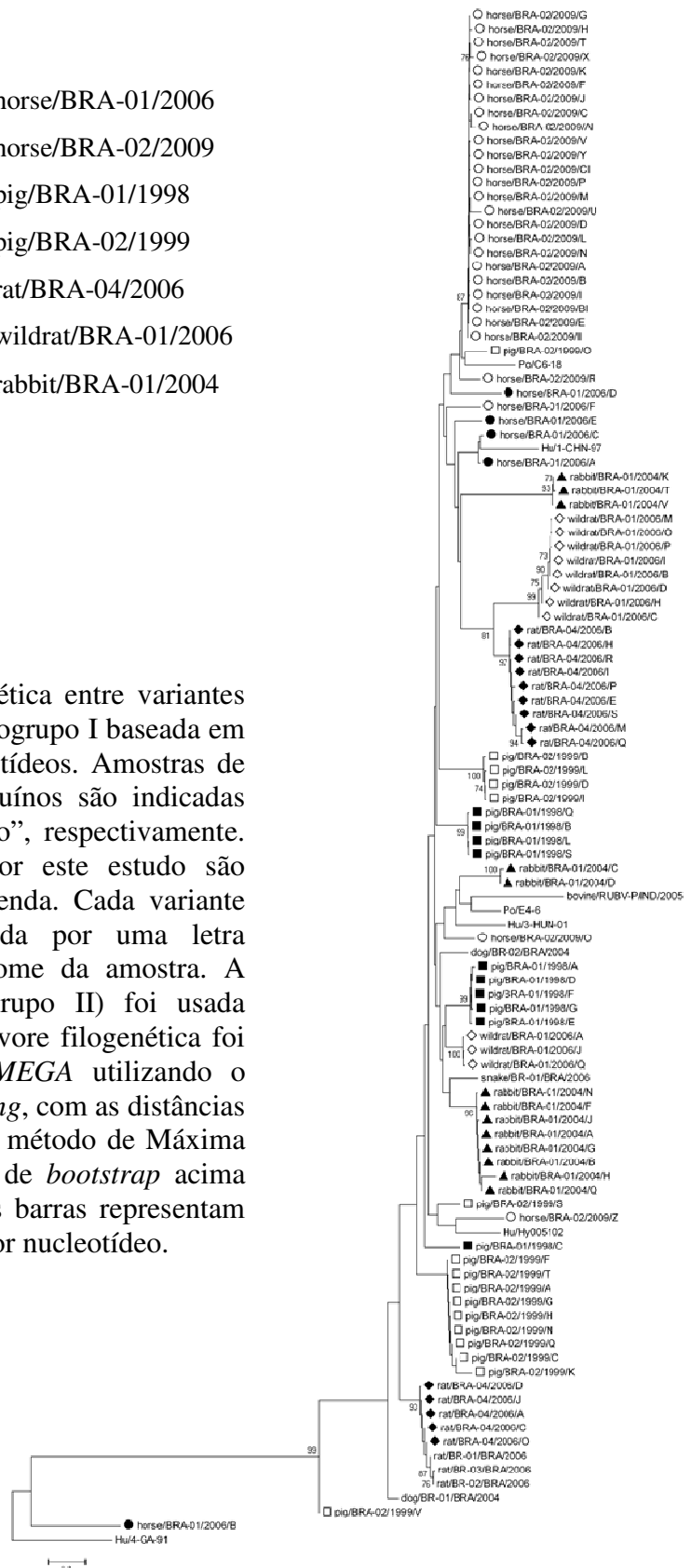
corrigida ao longo da sequência essa mutação pode alterar o *frame* de leitura da proteína levando a uma molécula defectiva de RPDR e a uma partícula viral imprópria. A sequência consenso formada por todas as variantes genômicas mostrou, pelas análises do *Blastn*, identidade com sequências de nucleotídeos de diferentes amostras de PBV detectados em águas residuárias nos Estados Unidos e identidade de 86% com a amostra de PBV de suíno C10-6. As sequências das variantes genômicas O e Z demonstraram ser diferentes das demais e na árvore filogenética estas variantes genômicas estão mais próximas aos PBV de humanos 3-HUN-01 e Hy005102, respectivamente (Figura 4).

Apesar de nem todas as sequências de nucleotídeos obtidas a partir da amostra PBV/pig/BRA-01/1998 terem sido analisadas, foi possível identificar dois grupos diferentes de variantes genômicas que apresentam sequências consenso próprias e uma variante genômica que não pôde ser adicionada em nenhum desses dois grupos (Figura 4 e Figura 5). As variantes genômicas B, L, Q e S apresentam uma inserção de seis nucleotídeos entre as posições 80 e 97, o que resulta na adição de três aminoácidos na sequência da proteína (Figura 5). A variante genômica C, que apresenta uma sequência de nucleotídeos diferente dos dois grupos, está mais próxima ao ramo da árvore filogenética em que se encontram variantes genômicas da outra amostra de PBV de suíno PBV/pig/BRA-02/1999. A análise pelo *Blastn* mostrou que a sequência consenso do grupo formado pelas variantes genômicas A, D, E, F e G tem similaridade com PBV identificados em amostras de esgoto e apresentou 90% de identidade com a amostra de PBV de humano Castellon-3880. A sequência consenso do outro grupo também mostrou similaridade com amostras de PBV identificados em esgoto e mostrou-se 82% idêntica à amostra de PBV de suíno C10-6.

Legenda

- Amostra PBV/horse/BRA-01/2006
- Amostra PBV/horse/BRA-02/2009
- Amostra PBV/pig/BRA-01/1998
- Amostra PBV/pig/BRA-02/1999
- ◆ Amostra PBV/rat/BRA-04/2006
- ◇ Amostra PBV/wildrat/BRA-01/2006
- ▲ Amostra PBV/rabbit/BRA-01/2004

Figura 4. Relação filogenética entre variantes genômicas de PBV do genogrupo I baseada em suas sequências de nucleotídeos. Amostras de PBV de humanos e de suínos são indicadas pelos prefixos “Hu” e “Po”, respectivamente. As sequências obtidas por este estudo são indicadas conforme a legenda. Cada variante genômica está identificada por uma letra maiúscula no final do nome da amostra. A amostra 4-GA-91 (genogrupo II) foi usada como grupo externo. A árvore filogenética foi inferida pelo programa *MEGA* utilizando o método de *Neighbor-Joining*, com as distâncias evolutivas calculadas pelo método de Máxima Verossimilhança. Valores de *bootstrap* acima de 70% são indicados. As barras representam unidades de substituição por nucleotídeo.



```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
PBV/pig/BRA-01/1998/C ---TTGGTGTGGATGTTTCCATTGCGCGTTAACGTCGAAGAACTACGGTTTACCAGCCGGCAATTGAAGCAGCCCAAGA-CTTCAATTG---GTTC
PBV/pig/BRA-01/1998/A ---.....C.A..T.....A..CT..T..A.C.G..T..A..ATTT.....C..A..A..-G.....A.C-----C.
PBV/pig/BRA-01/1998/D ---.....C.A..T.....A..CT..T..A.C.G..T..A..ATTT.....C..A..A..-G.....A.C-----C.
PBV/pig/BRA-01/1998/E ---.....C.A..T.....A..CT..T..A.C.G..T..A..TTT.....C..A..A..-G.....A.C-----C.
PBV/pig/BRA-01/1998/F ---.....C.A..T.....A..CT..T..A.C.G..T..A..ATTT.....C..A..A..-G.....A.C-----C.
PBV/pig/BRA-01/1998/G ---.....C.A..T.....A..CT..T..A.C.G..T..A..ATTT.....C..A..A..-G.....A.C-----C.
PBV/pig/BRA-01/1998/B ---.....C..T..T.....T.CC..T..G..A..G..G..T.....TCTG.....TATG.....TCCGG..AGT..A..CCACAT...
PBV/pig/BRA-01/1998/L CGA.....C..T..T.....T.CC..T..G..A..G..G..T.....TCTG.....TATG.....TCCGG..AGT..A..CCACAT...
PBV/pig/BRA-01/1998/Q ---.....T..T..T.....T.CC..T..G..A..G..G..T.....TCTG.....TATG.....TCCGG..AGT..A..CCACAT...
PBV/pig/BRA-01/1998/S ---.....C..T..T.....T.CC..T..G..A..G..G..T.....TCTG.....TATG.....TCCGG..AGT..A..CCACAT...

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
PBV/pig/BRA-01/1998/C CAGCGTGGGTTTCGATGGAATCAGTCGATGCTAGGATCAGCGAGCTATTGTATACAAAAGATCCTAAAGACCTGGTAATCTGTACAGACTTCAGCAAGTT
PBV/pig/BRA-01/1998/A .C..T.....AGCT..T..CGAG..T..G..AAAC.....TGCCA.G..C..C.....G..CAGA..G..T..A..CG..G.....C.....
PBV/pig/BRA-01/1998/D .....T.....AGCT..T..CGAG..T..AAAC.....TGCCA.G..C..C.....G..CAGA..G..T..A..CG..G.....C.....
PBV/pig/BRA-01/1998/E .....T.....AGCT..T..CGAG..T..AAAC.....TGCCA.G..C..C.....G..CAGA..G..T..A..CG..G.....C.....
PBV/pig/BRA-01/1998/F .....T.....AGCT..T..CGAG..T..AAAC.....TGCCA.G..C..C.....G..CAGA..G..T..A..CG..G.....C.....
PBV/pig/BRA-01/1998/G .....T.....AGTT..T..CGAG..T..AAAC.....TGCCA.G..C..C.....G..CAGA..G..T..A..CG..G.....C.....
PBV/pig/BRA-01/1998/B .T..T.....AGC.....G.....G.....CG..GC.....TG..TA..G.....T..G..GA.....C..TT..A..G..T.....T.....
PBV/pig/BRA-01/1998/L .T..T.....AGC.....G.....G.....CG..GC.....TG..TA..G.....T..G..GA.....C..TT..A..G..T.....T.....
PBV/pig/BRA-01/1998/Q .T..T.....AGC.....G.....G.....CG..GC.....TG..TA..G.....T..G..GA.....C..TT..A..G..T.....T.....
PBV/pig/BRA-01/1998/S .T..T.....AGC.....G.....G.....CG..GC.....TG..TA..G.....T..G..GA.....C..TT..A..G..T.....T.....

      210
PBV/pig/BRA-01/1998/C CGACCAGCAT
PBV/pig/BRA-01/1998/A .....A...
PBV/pig/BRA-01/1998/D .....A...
PBV/pig/BRA-01/1998/E .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/F .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/G .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/H .....A...
PBV/pig/BRA-01/1998/I .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/J .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/K .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/L .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/M .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/N .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/O .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/P .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/Q .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/R .....A..C
PBV/pig/BRA-01/1998/S .....A...

```

Figura 5. Alinhamento das variantes genômicas da amostra PBV/pig/BRA-01/1998.

Um padrão similar de agrupamento pôde ser verificado para a amostra PBV/pig/BRA-02/1999: dois grupos de variantes genômicas e duas variantes genômicas que não se encaixam em nenhum dos grupos formados (Figura 6). As variantes genômicas B, D, I e L foram agrupadas em um ramo da árvore filogenética e as variantes genômicas A, C, F, G, H, K, N, G e T estão em outro ramo. As variantes genômicas O e S não apresentaram similaridades com nenhum desses grupos (Figura 4). As variantes genômicas K e V não puderam ser completamente sequenciadas, talvez por um problema na técnica. Assim, a variante genômica V não está localizada juntamente com nenhum dos grupos na árvore filogenética, estando mais próxima ao grupo externo. A máxima identidade das sequências consenso dos grupos BDIL e ACFGHKNGT foi de 75% com a amostra de PBV identificado em esgoto Maryland_Raw_Sewage18 e 97% com a amostra de

PBV de suíno E4-8, respectivamente. Na árvore filogenética a variante genômica O se encontra próximo à amostra de PBV de suíno C6-18.

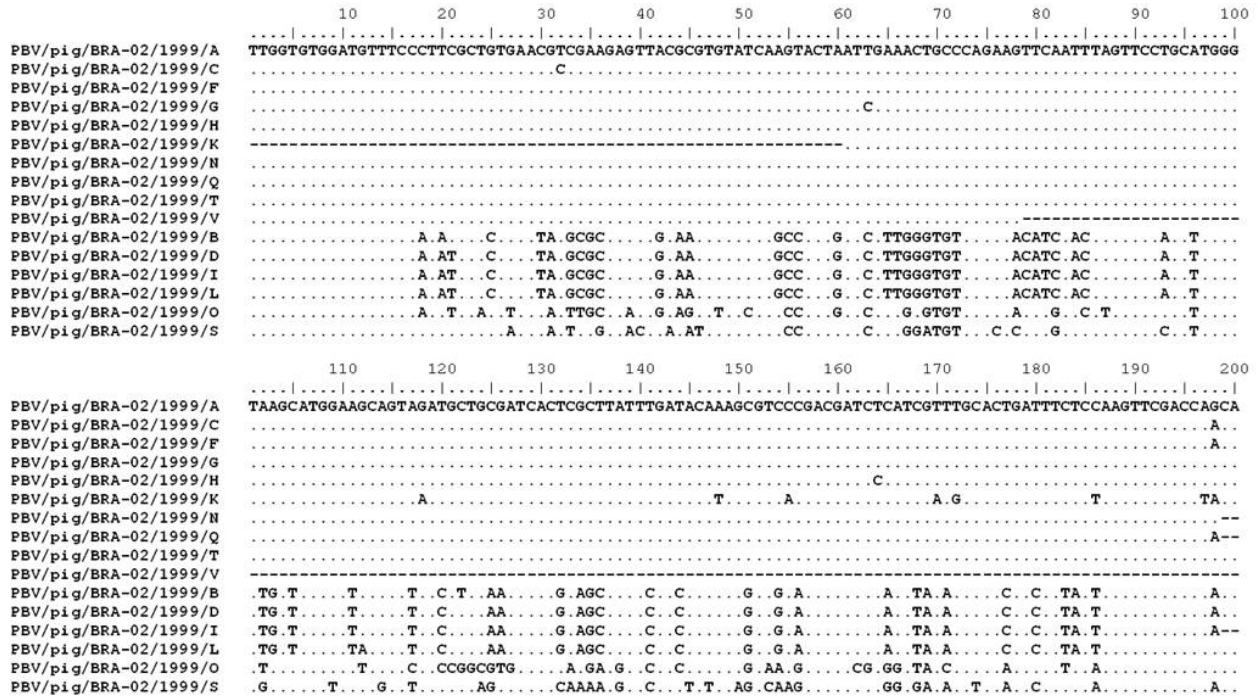


Figura 6. Alinhamento das variantes genômicas da amostra PBV/pig/BRA-02/1999.

As 14 variantes genômicas da amostra PBV/rat/BRA-04/2006 também puderam ser divididas em dois grupos: variantes genômicas A, C, D, J e O e variantes genômicas B, E, H, I, M, P, Q, R e S (Figuras 4 e 7). A sequência consenso do primeiro grupo demonstrou ser 100% idêntica às três sequências de nucleotídeos de PBV de ratos disponíveis no *GenBank* (rat/BR-01/BRA/2006, rat/BR-03/BRA/2006 e rat/BR-02/BRA/2006). Já a sequência consenso do outro grupo apresentou uma identidade que variou de 72 a 74% com amostras de PBV identificados em esgoto.

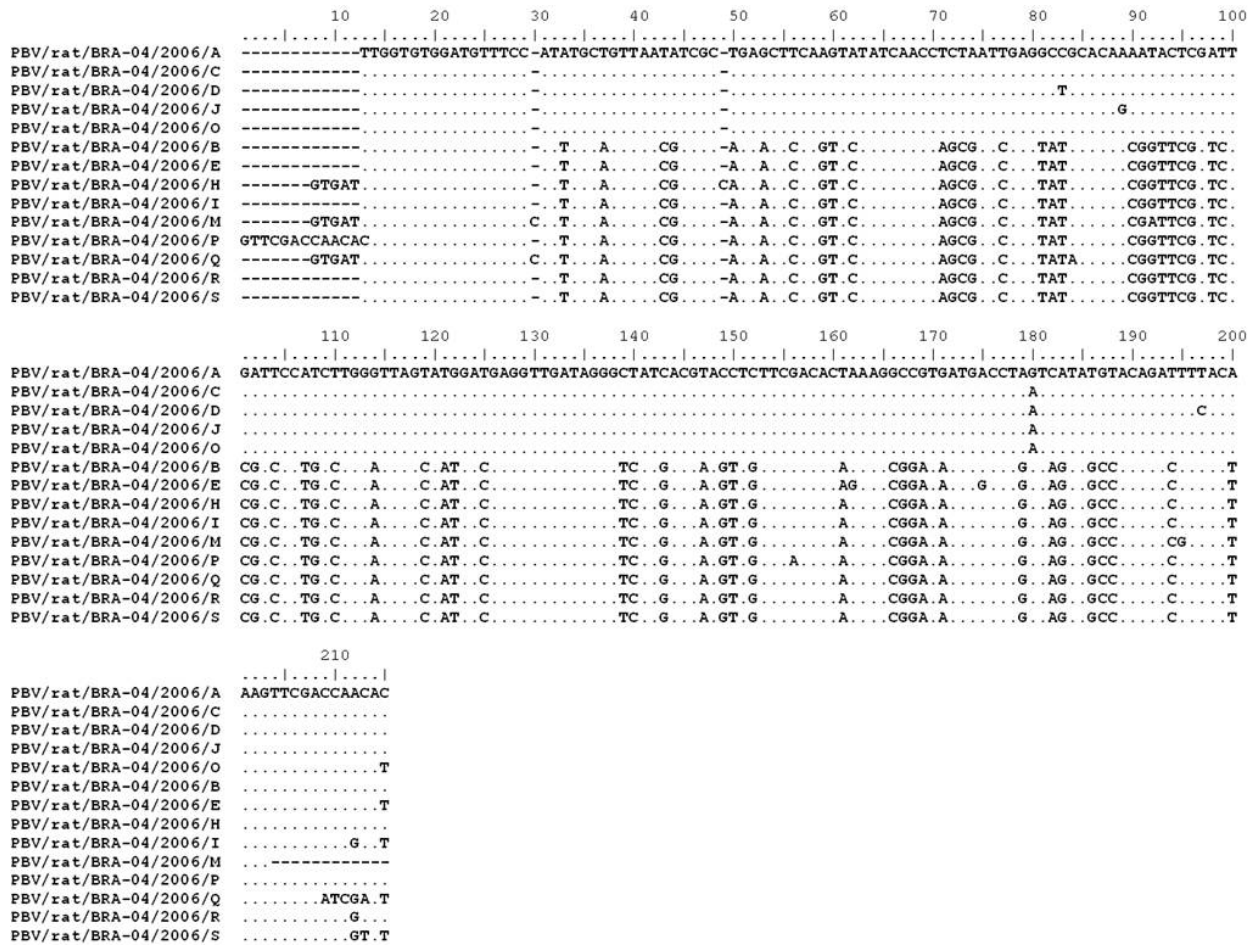


Figura 7. Alinhamento das variantes genômicas da amostra PBV/rat/BRA-04/2006.

Dois grupos de variantes genômicas puderam ser formados a partir da amostra PBV/wildrat/BRA-01/2006, apesar desta ter demonstrado a menor variação de identidade entre essas variantes genômicas (Figura 8 e Tabela 2). Os dois grupos podem ser vistos na árvore filogenética e suas sequências consenso apresentaram identidade com amostras de PBV identificados em esgoto variando entre 81 a 86% para o grupo formado pelas variantes genômicas A, J e Q e entre 67 a 73% para o grupo formado pelas outras variantes genômicas (Figura 4).

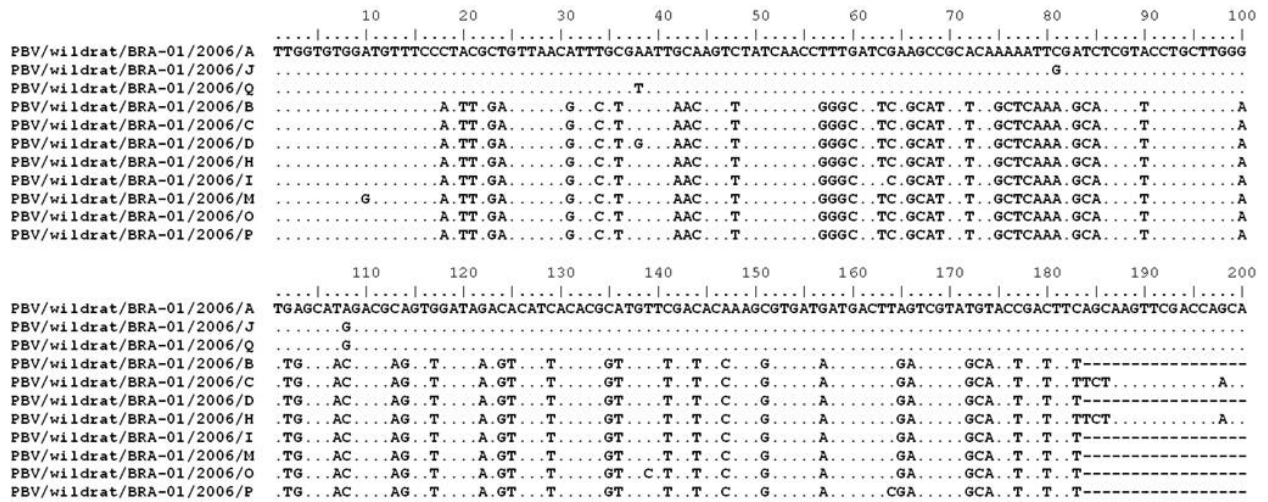


Figura 8. Alinhamento das variantes genômicas da amostra PBV/wildrat/BRA-01/2006.

As variantes genômicas da amostra PBV/rabbit/BRA-01/2004 puderam ser separadas em três grupos de sequências de nucleotídeos (Figura 9) que pertencem a três diferentes ramos na árvore filogenética (Figura 4). O ramo formado pelas variantes genômicas A, B, F, G, H, J, N e Q está mais relacionado com a amostra de PBV de cobra snake/BR-01/BRA/2006 e a sequência consenso deste grupo apresentou-se 77% idêntica à sequência de nucleotídeo desse PBV pelas análises do *Blastn*. Apesar de terem quantidades de nucleotídeos diferentes, as variantes genômicas C e D, que formam o outro grupo, são 100% idênticas e sua sequência consenso apresentou o maior valor de identidade (75%) com a sequência nucleotídica de PBV de suíno E2-5. Na árvore filogenética esse grupo se encontra próximo à amostra de PBV de suíno E4-6. As últimas três variantes genômicas (K, T e V) mostraram uma contaminação na sequência entre os nucleotídeos 21 e 81. Esta parte da sequência não se assemelha a nenhuma sequência de nucleotídeos de PBV. A sequência entre os nucleotídeos 1 a 20 se refere ao iniciador PicoB25 e a sequência entre os nucleotídeos 81 e 201 apresentou 78% de identidade com a sequência de nucleotídeos de PBV de humano 2005000756MN pela análise do *Blastn*. Este grupo de variantes

genômicas também apresentou uma deleção de três nucleotídeos da posição 171 a 173, resultando na deleção de um aminoácido na sequência da proteína.

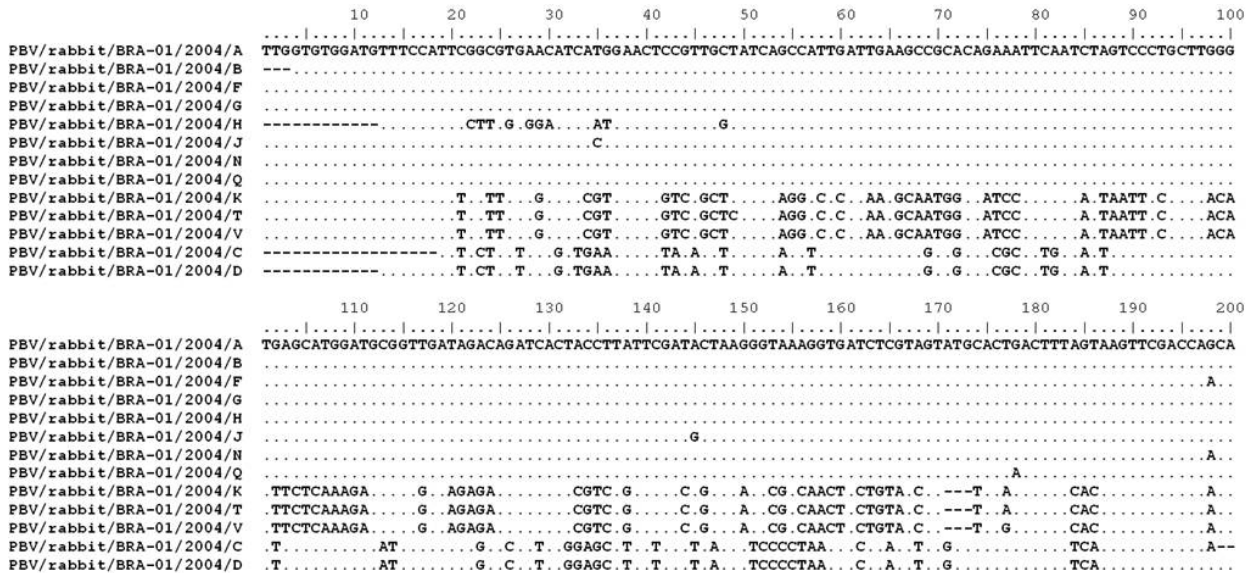


Figura 9. Alinhamento das variantes genômicas da amostra PBV/rabbit/BRA-01/2004.

Comparando-se todas as sequências de nucleotídeos diferentes, incluindo-se as sequências consenso e as sequências únicas de cada amostra de PBV, o maior valor de identidade observado pela matriz de identidade foi de 81,5%. Nessa comparação, a amostra PBV/horse/BRA-02/2009 foi a mais distante de todas as outras, com uma identidade menor que 32,8%.

Atualmente existem 404 sequências de nucleotídeos de PBV disponíveis no *GenBank*, porém não havia nenhuma padronização com relação à nomenclatura das amostras de PBV. Tendo em vista o aumento no número de trabalhos publicados referentes ao PBV e o crescente depósito de sequências de nucleotídeos desses vírus em bancos de dados, resolvemos propor uma padronização na nomenclatura dos PBV. Essa padronização se baseia no hospedeiro, no país e no ano de identificação da amostra nominada. Por exemplo, caso a 7ª amostra fecal de suíno, datada de 2006, no Brasil, seja identificada como positiva para PBV em EGPA e RT-PCR para o

genogrupo I, a nomenclatura desta será: GI strain PBV/pig/BRA-07/2006 (FREGOLENTE & GATTI, 2009).

6 DISCUSSÃO

Picobirnavírus têm sido amplamente estudados devido à sugestão de que estes vírus de RNA apresentam um papel importante como patógenos emergentes e oportunistas em casos de diarreia em humanos (BHATTACHARYA et al., 2006; GIORDANO et al., 2008) e outros animais (WANG et al., 2007), como também sugere-se que tenham associação com casos de gastroenterites em pacientes HIV positivos (GROHMANN et al., 1993; GIORDANO et al., 1999). Além disso, a identificação de sequências de nucleotídeos de PBV de animais proximamente relacionadas àsquelas de PBV de humanos sugere o potencial zoonótico destes vírus (GANESH et al., 2010). A recente proposta de nomenclatura para PBV constitui uma importante ferramenta para a padronização da nomenclatura das diferentes amostras de PBV que atualmente estão sendo publicadas e depositadas em bancos de dados (FREGOLENTE & GATTI, 2009).

Neste trabalho, PBV foram detectados utilizando EGPA (6,51%) e o genogrupo I de PBV foi identificado em 29 das 63 amostras fecais positivas em EGPA (46%) com o uso da RT-PCR. A taxa de identificação pela EGPA está de acordo com o preconizado na literatura, onde PBV são identificados em menos de 10% das amostras fecais analisadas (MASACHESSI et al., 2007; BÁNYAI et al., 2008; GIORDANO et al., 2008). Apesar da baixa taxa de identificação total, alguns hospedeiros, como ratos e suínos, se destacaram com valores altos de detecção desses vírus, com 25% e 43,24%, respectivamente. Bovinos, cães, cavalos, coelhos, ratos, ratos silvestres e suínos já haviam sido descritos como hospedeiros para PBV (PEREIRA et al., 1988b;

GATTI et al., 1989; VANOPDENBOSCH & WELLEMANS, 1989; BROWNING et al., 1991; GALLIMORE et al., 1993; COSTA et al., 2004). Neste trabalho, pela primeira vez foram descritos PBV em amostras de fezes de capivaras e cobras.

Nem todos os PBV identificados por EGPA neste trabalho, após aplicação do teste de RT-PCR, puderam ser incluídos em um dos dois genogrupos propostos por BÁNYAI e colaboradores (2003). Das 63 amostras de fezes positivas para PBV em EGPA, apenas 29 foram classificadas como sendo PBV do genogrupo I. Nenhuma amostra foi positiva nos testes de RT-PCR para o genogrupo II. A incidência do genogrupo II está descrita em poucos estudos com baixas porcentagens de identificação (BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007; VAN LEEUWEN et al., 2010), talvez pelo fato da pouca abrangência do par de iniciadores que define este genogrupo. A não detecção de PBV usando o conjunto de iniciadores para o genogrupo II em amostras de PBV identificadas em tantos hospedeiros diferentes pode significar sua relação de especificidade com PBV de perfil curto, identificados em humanos (BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007). O fato é que se existem amostras fecais positivas para PBV em EGPA, mas estes não podem ser identificados em RT-PCR por nenhum dos genogrupos propostos, existem PBV que não pertencem a nenhum desses genogrupos. Assim, esta ferramenta, da maneira como está sendo utilizada, não é a melhor para se classificar os PBV. Continuam sendo necessários estudos que definam por uma sequência nucleotídica única e conservada, que permita o desenho de iniciadores capazes de diagnosticar todos os PBV. Ainda, uma classificação dos PBV em genogrupos, ou até mesmo em genotipos diferentes, só será possível após estudos que definam porcentagens limites de identidade, para cada um dos segmentos, assim como já está descrito para rotavírus (MATTHIJNSSENS et al., 2008)

Outro fato que colabora para que se repense a classificação dos PBV é a detecção do genogrupo I em diferentes hospedeiros (FREGOLENTE et al., 2009). Essa identificação deveria indicar a circulação entre eles de vírus semelhantes, demonstrando que não existe uma especificidade entre genogrupos e espécies de hospedeiros. Porém, como foi mostrado por este trabalho e por outros na literatura (BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007; BÁNYAI et al., 2008), PBV podem apresentar sequências de nucleotídeos muito diferentes, mesmo sendo todos classificados atualmente como pertencentes ao genogrupo I.

Mesmo propondo uma alteração nesse sistema de classificação, neste trabalho temos a primeira detecção de genogrupo I de PBV em cães, cavalos, cobras, coelhos, ratos e ratos silvestres.

Não foi possível a obtenção das sequências completas dos segmentos genômicos do PBV por nenhuma das técnicas utilizadas, mesmo após as diversas tentativas de ajustes nos protocolos propostos por diferentes autores (YANG et al., 2004; WAKUDA et al., 2005; POTGIETER et al., 2009). Na tentativa de encontrar a falha nos protocolos, passamos a verificar cada etapa para a presença do amplificado de 201pb, esperado como produto da RT-PCR para genogrupo I de PBV. Mesmo tendo sido verificada a presença do amplificado após a extração do RNA segundo as metodologias descritas nos itens 3.3 e 3.5, após a etapa de purificação o amplificado não foi mais detectado. Mesmo com o uso de diferentes sistemas de purificação, a RT-PCR foi sempre negativa. Esses resultados nos sugerem que seria o sistema de purificação e concentração utilizado que estaria, de alguma maneira, impedindo que o dsRNA permaneça na reação. A degradação do RNA, tanto na presença quanto na ausência do inibidor de RNase, não pode ser descartada, mas o sistema de purificação parece estar envolvido para os resultado negativos. Uma das hipóteses é a de que a coluna do sistema não estaria retendo esse material no primeiro

momento, ou por falha do sistema ou por degradação do RNA. Apesar da ineficiência dos sistemas testados, estes são ferramentas importantes para que o volume de dsRNA na reação de RT-PCR seja mantido e para que os reagentes não envolvidos nas próximas reações sejam eliminados.

A tentativa de ampliações parciais que se sobrepusessem nas sequências também não foi eficaz. Neste caso, como o desenho dos iniciadores foi baseado em sequências de nucleotídeos de PBV de humanos disponíveis no *GenBank*, e, visto que, existe grande heterogeneidade nas sequências de nucleotídeos desses vírus e, talvez, por não testarmos nenhuma amostra de PBV de origem de humanos, não houve alinhamento dos novos iniciadores com os PBV aqui estudados.

A não obtenção da sequência nucleotídica total dos PBV também não nos permitiu a identificação de uma região conservada que permitisse o desenho de iniciadores capazes de diagnosticar todos os picobirnavírus. Desta maneira, não foi possível contribuir com a proposição de características genéticas que permitissem uma melhor classificação para estes vírus.

O estudo envolvendo o sequenciamento direto dos amplificados do genogrupo I de PBV foi o primeiro a apresentar uma análise filogenética que incluísse sequências de nucleotídeos de PBV de cães, cobra e ratos, já que na literatura os trabalhos incluíam apenas sequências nucleotídicas de PBV identificados em humanos e suínos (ROSEN et al., 2000; MATÍNEZ et al., 2003; BÁNYAI et al., 2003 e 2008; WAKUDA et al., 2005; BHATTACHARYA et al., 2006 e 2007; CARRUYO et al., 2008). Os resultados desse estudo mostram que os valores de identidade foram maiores para as três sequências de nucleotídeos de PBV de ratos do que entre os outros hospedeiros. Esse resultado é semelhante ao obtido por BÁNYAI e colaboradores (2008) e CARRUYO e colaboradores (2008), sendo que estes últimos demonstraram que o clone de PBV

de suíno PBV1-POR tinha 77% de identidade com a amostra referência para genogrupo I de PBV, 1-CHN-97. Quando comparada com as nossas amostras de PBV, esta amostra de PBV de humano se encontra no mesmo ramo da árvore filogenética que a amostra de PBV de cão dog/BR-02/BRA/2004.

A partir da análise da matriz de identidade entre as sequências de nucleotídeos obtidas, o maior valor de identidade entre PBV de diferentes hospedeiros ocorreu entre aqueles identificados em ratos e cobra. As cobras inseridas nesse estudo eram mantidas em cativeiro e recebiam ratos como alimento. Essa situação suporta a hipótese de que PBV podem ser transmitidos dos ratos para as cobras pela alimentação. Ou ainda, PBV poderiam estar infectando os ratos e as cobras serviriam apenas como carreadoras dos vírus, sem estarem infectadas (PEREIRA et al., 1988b). Essas hipóteses se baseiam apenas no alto valor de identidade encontrado entre as sequências nucleotídicas dos PBV identificados nesses hospedeiros, ou seja 73%. Apesar das amostras de fezes dos dois hospedeiros terem sido coletadas no mesmo ano (2006), os ratos positivos para PBV não foram aqueles que serviram de alimentos à cobra, que também foi positiva para esses vírus. Novos estudos que definam pela forma de transmissão dos PBV entre esses dois hospedeiros, de classes diferentes, são necessários para que essa afirmativa possa ser definida como verdadeira.

A análise filogenética das sequências nucleotídicas obtidas por este estudo com aquelas de PBV de suínos e humanos disponíveis no *GenBank* mostra que PBV de cão, dog/BR-02/BRA/2004, e os três PBV de ratos estão mais próximos a PBV de humanos do que de suínos. Ainda, conclui-se que PBV de humano, amostra 3-HUN-01, e de suíno, PBV4-POR, pertencem ao mesmo ramo da árvore filogenética. Esta última assertiva foi observada também por CARRUYO e colaboradores (2008), que fizeram o sequenciamento da amostra PBV4-POR. A

identificação de PBV proximamente relacionados em diferentes hospedeiros sugere que esses vírus podem circular numa variedade de animais, incluindo os homens, o que suporta seu potencial zoonótico (GANESH et al., 2010).

Sequências nucleotídicas heterogêneas são esperadas em vírus de genoma de RNA que infectam diferentes hospedeiros, mesmo sendo esses hospedeiros pertencentes à mesma espécie (DOMINGO & HOLLAND, 1997). Estudos recentes vêm demonstrando uma diversidade genética nas amostras de PBV do genogrupo I (BÁNYAI et al., 2008; FREGOLENTE et al., 2009; GOSH et al., 2009), o que levou à sugestão de que esses vírus poderiam existir como quasiespécies (BÁNYAI et al., 2008). No estudo envolvendo o sequenciamento de amostras de PBV após sua clonagem, foi verificada uma alta taxa de heterogeneidade entre as variantes genômicas de cada PBV, com uma identidade de nucleotídeos mais variável do que aquela observada por BÁNYAI e colaboradores (2008). Este fato é esperado para vírus de genoma de RNA devido à falta de correção da polimerase (MOYA et al., 2004) e sugere que a RPDR dos PBV também tem uma alta taxa de erro, como ocorre com outras RNA polimerases.

Baseando-se na análise da matriz de identidade de nucleotídeos entre as sequências intra-amostras de PBV incluídas nesse estudo, o PBV menos heterogêneo foi o encontrado em rato silvestre PBV/wildrat/BRA-01/2006 (59,7 a 99,5% de identidade). Esses animais eram de ambientes de vida livre, onde o contato entre os indivíduos tende a ser menor do que aquele em ambiente de confinamento. O contato entre os hospedeiros desempenha um papel importante na transmissão viral, conseqüentemente é importante para sua manutenção e evolução. Quanto mais contato ocorre, maior pode ser a transmissão viral entre os hospedeiros e a chance de uma co-infecção com diferentes populações virais aumenta. Dessa maneira, uma maior variabilidade viral é esperada em hospedeiros que vivem em ambientes que permitam um maior contato entre os

indivíduos, mesmo que, estando confinados em um mesmo ambiente, estes indivíduos sofram as ações das mesmas pressões de seleção. Nossos resultados estão de acordo com essa hipótese quando mostram que todos os PBV obtidos a partir de hospedeiros em cativeiro apresentaram uma taxa de identidade mais variável do que aqueles de vida livre (Tabela 2).

Apesar do alto grau de variabilidade entre as sequências de nucleotídeos das variantes genômicas de PBV, pelo menos uma sequência consenso pôde ser gerada para cada um dos PBV estudados. As duas amostras de PBV identificadas em cavalos apresentaram apenas uma sequência consenso, já as demais amostras apresentaram mais de uma. Cada sequência consenso é considerada o centro da nuvem da quasispécie, a partir da qual cada variante genômica se origina (EIGEN, 1993). Isso sugere que em todos os animais analisados PBV exibiam o fenômeno da quasispécie e ainda que todos os animais, exceto os cavalos, apresentavam co-infecção de diferentes PBV. Caso estes diferentes PBV co-infectem a mesma célula, pode acontecer um *reassortment* (*genetic shift*), tendo em vista que estes vírus apresentam o genoma segmentado. O *reassortment* pode ocasionar um salto entre espécies-hospedeiras, caso a análise da sequência do outro segmento genômico do PBV pressuponha ou indique uma relação espécie-específica. Estudos futuros são necessários para que se detecte o *reassortment* em células infectadas por PBV.

A árvore filogenética com as amostras de PBV aqui analisadas suporta as análises comparativas da matriz de identidade e do *Blastn* para cada PBV. Como observado em estudo anterior, a amostra de PBV de bovino RUBV-P/IND/2005 está no mesmo ramo que uma amostra de PBV de suíno, neste caso a amostra E4-6 (GOSH et al., 2009). Cada ramo representa o grupo de sequências formado pelas variantes genômicas mais próximas de cada PBV e a maior parte dos ramos está suportada por valores de *bootstrap* acima de 70%. Sequências de nucleotídeos

mais heterogêneas são observadas isoladas dos grupos, como pode ser observado para a variante genômica PBV/horse/BRA-01/2006/B, variantes genômicas O e Z da amostra PBV/horse/BRA-02/2009, variante genômica PBV/pig/BRA-01/1998/C e variantes genômicas O e S da amostra PBV/pig/BRA-02/1999. A variante genômica PBV/horse/BRA-01/2006/B é tão diferente das demais que está mais próxima da amostra 4-GA-91, grupo externo e amostra referência para o genogrupo II, do que das demais amostras do genogrupo I. Isto pode ser resultado da extensa deleção observada nessa variante genômica. A variante genômica PBV/horse/BRA-02/2009/Z também apresenta diferenças que a aproxima da amostra de PBV de humano Hy005102 e as variantes genômicas A e C da amostra PBV/horse/BRA-01/2006 são mais próximas da amostra referência para genogrupo I de PBV 1-CHN-97. De maneira geral, esses resultados suportam o potencial zoonótico dos PBV sugerido por GANESH e colaboradores (2010).

Apesar da detecção de duas populações de variantes genômicas de PBV na amostra PBV/rat/BRA-04/2006, apenas uma delas está no mesmo ramo que as outras três amostras de PBV de ratos depositadas no *GenBank*. Isto sugere que apenas essa população é próxima aos PBV de mesmo hospedeiro. De maneira semelhante, a população formada pelas variantes genômicas A, B, F, G, H, J, N e Q, da amostra PBV/rabbit/BRA-01/2004, foi agrupada em um ramo com a amostra de PBV de cobra snake/BR-01/BRA/2006.

Mutações positivas ou neutras podem ser consideradas melhores que mutações deletérias porque mutantes originários daquelas produzirão descendência, enquanto aqueles originários destas não produzirão. Portanto, as mutações de ponto geradas numa população viral apresentando quasispécie, especialmente aquelas mutações que ocorrem nos primeiros dois nucleotídeos do códon, têm uma chance maior de serem mantidas pela seleção natural (EIGEN, 1993). Neste estudo, as mutações observadas foram predominantemente de ponto que não

alteraram o domínio característico D-T/S-D da RPDR de PBV. Enquanto outras análises são necessárias para se definir se essas mutações são positivas ou neutras, como elas não alteram o domínio da RPDR, elas não parecem ser deletérias. Estudos futuros que analisem toda a sequência de nucleotídeos do segmento menor são necessários para que se determine se as deleções e inserções observadas na sequência parcial de nucleotídeo podem alterar a função da polimerase.

Enquanto a maioria das características associadas a vírus de RNA que geram quasiespécie tenham sido identificadas em PBV, a presença de quasiespécies nesses vírus não havia sido confirmada até o momento. Nesse estudo foi demonstrada a presença de variantes genômicas dentro de cada PBV e a co-existência de diferentes populações de PBV em um mesmo indivíduo hospedeiro. Esses resultados sugerem a existência de quasiespécie em PBV em diferentes hospedeiros e confirmam o potencial emergente desses vírus.

A presença de vírus em seus hospedeiros por um longo período de tempo, no caso de infecções do tipo persistente, pode ser decorrente da baixa afinidade de anticorpos produzidos contra esses vírus, ou ainda, por mecanismos de escape viral. Este tipo de infecção foi verificado em animais de cativeiro infectados por PBV (HAGA et al., 1999; MASACHESSI et al., 2007) e pode ter colaborado para a manutenção de quasiespécies, já que partículas virais variadas podem se formar na progênie.

De maneira geral, foram identificados PBV que não se apresentavam como quasiespécie em seus hospedeiros (rat/BR-01/BRA/2006, rat/BR-02/BRA/2006, rat/BR-03/BRA/2006, snake/BR-01/BRA/2006, dog/BR-01/BRA/2004 e dog/BR-02/BRA/2004) e PBV que apresentavam esse padrão (PBV/horse/BRA-01/2006, PBV/horse/BRA-02/2009, PBV/pig/BRA-01/1998, PBV/pig/BRA-02/1999, PBV/rat/BRA-04/2006, PBV/wildrat/BRA-01/2006 e

PBV/rabbit/BRA-01/2004). Em ambos os casos, foi observada uma heterogeneidade nas sequências de nucleotídeos entre esses PBV, que pertencem todos ao genogrupo I. Ainda, todas as sequências obtidas são referentes a uma região do gene da RPDR, que, sendo uma proteína não-estrutural, deveria apresentar um gene mais conservado do que um gene de uma proteína estrutural.

Uma zoonose é caracterizada pela transmissão de agentes de animais para o homem. No caso dos vírus, para que esta transmissão tenha sucesso é importante que haja, inicialmente, a interação específica entre as proteínas estruturais dos vírus (anti-receptores) com as proteínas de superfície celular (receptores) que permitam a adsorção e a entrada dos vírus na célula hospedeira. Assim, o conhecimento das proteínas estruturais dos PBV de diferentes hospedeiros é fundamental para que o potencial zoonótico destes vírus seja estabelecido. Apesar de não contarmos com as sequências de nucleotídeos do segmento maior de PBV, podemos sugerir seu potencial zoonótico pela comparação das sequências do segmento menor, já que a ação da polimerase também pode determinar uma restrição de espécie de hospedeiro. Uma incompatibilidade entre a RPDR e a maquinaria celular impediria a correta replicação destes vírus. A emergência de uma zoonose depende tanto da capacidade do vírus em adsorver e entrar corretamente na célula, como da sua capacidade de replicação, sem levar em conta os aspectos intrínsecos aos hospedeiros (HAAGMANS et al., 2009).

Portanto, novos estudos são necessários para que haja um maior conhecimento de PBV de diferentes hospedeiros que definam: a) uma melhor classificação desses vírus; b) sua(s) forma(s) de transmissão; e c) o potencial zoonótico desses vírus e de uma possível associação a doenças emergentes.

7 CONCLUSÕES

Objetivando a caracterização genética e filogenética de picobirnavírus identificados em amostras fecais de diferentes hospedeiros naturais e após sequenciamento parcial do segmento genômico menor, responsável pela codificação da RPDR, pode-se concluir ou mesmo sugerir que:

1. Para PBV, não existe uma especificidade genogrupo-espécie de hospedeiro, visto que o genogrupo I de PBV foi identificado em cães, cavalos, cobras, coelhos, murinos e ratos silvestres.
2. Os resultados obtidos revelam a proximidade entre sequências de nucleotídeos do segmento menor de PBV identificados em humanos e em outros animais, o que suporta o potencial zoonótico desses vírus; dados sugerem que PBV detectados em ratos poderiam infectar cobras via oral, havendo também a possibilidade de transmissão entre animais.
3. A menor variação observada nas sequências de nucleotídeos de PBV identificados em ratos silvestres pode ser justificada pela tendência ao menor contato entre os animais não confinados do que entre os de cativeiro. Assim, a transmissão viral também é menor, o que justificaria a menor heterogeneidade na população viral.
4. Os resultados obtidos suportam o potencial emergente e zoonótico dos PBV, pois foi identificada a coexistência de duas ou mais populações de PBV em um mesmo hospedeiro, o que sugere um possível mecanismo de *reassortment*, que pode levar a um salto entre espécies.
5. As mutações de ponto observadas nas sequências do segmento menor sugerem heterogeneidade nas populações de PBV, porém não alteram o domínio característico da RPDR.
6. Sugere-se a presença de quasipécies em PBV detectados em suínos, cavalos, murino, rato silvestre e coelho.

7. O atual sistema de classificação para os PBV não é apropriado, devido à identificação de PBV não pertencentes a nenhum dos genogrupos já descritos e à presença de heterogeneidade nas sequências de PBV do genogrupo I. A partir do sequenciamento completo e análise do genoma de diferentes PBV será possível definir as porcentagens de identidade mínimas para sua classificação em genogrupos e/ou genotipos.

Infelizmente, não foi possível sequenciar o genoma completo dos PBV estudados e também não foi identificada nenhuma sequência conservada que permita o desenho de iniciadores capazes de unificar o diagnóstico dos PBV. Estudos complementares e tentativos ainda estão em andamento.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BÁNYAI, K; JAKAB, F; REUTER, G; BENE, J; ÚJ, M; MELEGH, B; SZÜCS, G. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. **Arch Virol**, n.148 (12), p.2281-2291, 2003.
- BÁNYAI, K; MARTELLA, V; BOGDÁN, Á; FORGÁCH, P; JAKAB, F; MELEG, E; BÍRÓ, H; MELEGH, B; SZÜCS, G. Genogroup I picobirnaviruses in pigs: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. **J Gen Virol**, n.89, p.534-539, 2008.
- BHATTACHARYA, R; SAHOO, G C; NAYAK, M K; SAHA, D R; SUR, D; NAIK, T N; BHATTACHARYA, S K; KRISHNAN, T. Molecular epidemiology of human picobirnaviruses among children of a slum community in Kolkata, India. **Infect Genet Evol**, n.6 (6), p.453-458, 2006.
- BHATTACHARYA, R; SAHOO, G C; NAYAK, M K; RAJENDRAN, K; DUTTA, P; MITRA, U; BHATTACHARYA, M K; NAIK, T N; BHATTACHARYA, S K; KRISHNAN, T. Detection of Genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. **Infect Genet Evol**, n.7 (2), p.229-238, 2007.
- BROWNING, G F; CHALMERS, R M; SNODGRASS, D R; BATT, R M; HART, C A; ORMAROD, S E; LEADON, D; STONEHAM, S J; ROSSDALE, P D. The prevalence of the enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. **Equine Vet J**, n.23 (6), p.405-409, 1991.
- BUZINARO, M G; FREITAS, P P S; KISIELLIUS, J J; UEDA, M; JEREZ, J A. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in calf faeces. **Vet J**, n.166 (2), p.185-187, 2003.
- CASCIO, A; BOSCO, M; VIZZI, E; GIAMMANCO, A; FERRARO, D; ARISTA, S. Identification of picobirnavirus from faeces of Italian children suffering from acute diarrhea. **Eur J Epidemiol**, n.12, p.545-547, 1996.

CARRUYO, G M; MATEU, G; MARTÍNEZ, L C; PUJOL, F H; NATES, S V; LIPRANDI, F; LUDERT, J E. Molecular characterization of porcine picobirnaviruses and development of a specific reverse transcription-PCR assay. **J Clin Microbiol**, n.46 (7), p.2402-2405, 2008.

COSTA, A P; CUBEL GARCIA, R C N; LABARTHE, N V; LEITE, J P G. Detection of double-stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. **Arq Bras Med Vet Zootec**, n.56 (4), p.554-557, 2004.

CUNLIFFE, N A; GLASS, R I. Gastrointestinal manifestation of HIV infection. **Lancet**, n.348 (9033), p.1037, 1996.

DOMINGO, E; HOLLAND, J J. RNA Virus mutations and fitness for survival. **Annu Rev Microbiol**, n.51, p.151–78, 1997.

DUQUERROY, S; DA COSTA, B; HENRY, C; VIGOUROUX, A; LIBERSOU, S; LEPAULT, J; NAVAZA, J; DELMAS, B; REY, F A. The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. **EMBO J**, n.28 (11), p.1655-1665, 2009.

EIGEN, M; SCHUSTER, P. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: emergence of the hypercycle. **Naturwissenschaften**, n.64 (11), p.541–65, 1977.

EIGEN, M. Viral quasispecies. **Sci Am**, n.269, p.42-49, 1993.

FINKBEINER, S R; ALLRED, A F; TARR, P I; KLEIN, E J; KIRKWOOD, C D; WANG, D. Metagenomic analysis of human diarrhea: viral detection and discovery. **PLoS Pathog**, n.4(2), p.1-9, 2008.

FREGOLENTE, M C D; DE CASTRO-DIAS, E; MARTINS, S S; SPILKI, F R; ALLEGRETTI, S M; GATTI, M S V. Molecular characterization of picobirnavirus from new hosts. **Virus Res**, n.143, p.134–136, 2009.

FREGOLENTE, M C D; GATTI, M S. Nomenclature proposal for picobirnavirus. **Arch Virol**, n. 154, p.1953-1954, 2009.

FREITAS, D. Avanços e perspectivas na caracterização do picobirnavírus: inoculação em linhagens celulares, histologia de intestino de ratos e testes de RT-PCR. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, pp 76, 2003.

GALLIMORE, C; LEWIS, D; BROWN, D. Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. **Arch Virol**, n.133 (1-2), p.63–73, 1993.

GALLIMORE, C I; GREEN, J; CASEMORE, D P; BROWN, D W. Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. **Arch Virol**, n.140 (7), p.1275-1278, 1995a.

GALLIMORE, C I; APPLETON, H; LEWIS, D; GREEN, J; BROWN, D W G. Detection and characterization of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. **J Med Virol**, n.45, p.135-140, 1995b.

GANESH, B; NATARAJU, S M; RAJENDRAN, K; RAMAMURTHY, T; KANUNGO, S; MANNA, B; NAGASHIMA, S; SUR, D; KOBAYASHI, N; KRISHNAN, T. Detection of closely related Picobirnaviruses among diarrhoeic children in Kolkata: Evidence of zoonoses? **Infect Genet Evol**, n.10 (4), p.511-516, 2010.

GATTI, M S; PESTANA DE CASTRO, A F; FERRAZ, M M G; FIALHO, A M; PEREIRA, H G. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. **Res Vet Sci**, n.47(3), p.397–398, 1989.

GATTI, M S V. Picobirnavírus: um novo vírus animal? Características gerais, infecção experimental em ratos e estudos epidemiológicos em suínos. Tese de doutorado, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 1994.

GIORDANO, M O; MARTINEZ, L C; RINALDI, D; ESPUL, C; MARTINEZ, N; ISA, M B; DEPETRIS, A R; MEDEOT, S I; NATES, S V. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. **AIDS Res Hum Retroviruses**, n.15 (16), p.1427-1432, 1999.

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

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

GONZÁLEZ, G G; PUJOL, F H; LIPRANDI, F; DEIBIS, L; LUDERT, J E. Prevalence of enteric viruses in human immunodeficiency virus seropositive patients in Venezuela. **J Med Virol**, n.55, p.288-292, 1998.

GREEN, J; GALLIMORE, C I; CLEWLEY, J P; BROWN, D W G. Genomic characterization of large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobirnavirus of *Cryptosporidium parvum*. **Arch Virol**, n.144 (12), p.2457-2465, 1999.

GROHMANN, G S; GLASS, R I; PEREIRA, H G; MONROE, S S; HIGHTOWER, A W; WEBER, R; BRYAN, R T. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. **N Engl J Med**, n.329 (1), p.14-20, 1993.

HAAGMANS, B L; ANDEWEG, A C; OSTERHAUS, A D M E. The application of genomics to emerging zoonotic viral diseases. **PLoS Pathog**, n.5 (10), e1000557, 2009.

HAGA, I R; MARTINS, S S; HOSOMI, S T; VICENTINI, F; TANAKA, H; GATTI, M S. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). **Vet J**, n.158 (3), p.234-236, 1999.

HERRING, A J; INGLIS, N F; OJEH, C K; SNODGRASS, D R; MENZIES, J D. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. **J Clin Microbiol**, n.16 (3), p.473-477, 1982.

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb>

LAMBDEN, P R; COOKE, S J; CAUL, E O; CLARKE, I N. Cloning of noncultivable human rotavirus by single primer amplification. **J Virol**, n.66 (3), p.1817-1822, 1992.

LEITE, J P G; MONTEIRO, S P; FIALHO, A M; PEREIRA, H G. A novel avian virus with trisegmented double-stranded RNA and further observations on previously described similar viruses with bisegmented genome. **Virus Res**, n.16 (2), p.119–126, 1990.

LUDERT, J E; HIDALGO, M; GIL, F; LIPRANDI, F. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. **Arch Virol**, n.117 (1-2), p.97–107, 1991.

LUDERT, J E; ABDUL-LATIFF, L; LIPRANDI, A; LIPRANDI, F. Identification of picobirnavirus, viruses with bisegmented double stranded RNA, in rabbit faeces. **Res Vet Sci**, n.59 (3), p.222–225, 1995.

MARTÍNEZ, L C; GIORDANO, M O; ISA, B M; ALVARADO, L F; PAVÁN, J V; RINALDI, D; NATES, S V. Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobirnavirus. **Intervirology**, n.46 (4), p.207-213, 2003.

MASACHESSI, G; MARTINEZ, L C; GIORDANO, M O; BARRIL, P A; ISA, B M; FERREYRA, L; VILLAREAL, D; CARELLO, M; ASIS, C; NATES, S V. Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. **Arch Virol**, n.152 (5), p.989-998, 2007.

MATTHIJNSSENS, J; CIARLET, M; RAHMAN, M; ATTOUI, H; BÁNYAI, K; ESTES, M M; GENTSCH, J R; ITURRIZA-GÓMARA, M; KIRKWOOD, C D; MARTELLA, V; MERTENS, P P C; NAKAGOMI, O; PATTON, J T; RUGGERI, F M; SAIF, L J; SANTOS, N; STEYER, A; TANIGUCHI, K; DESSELBERGER, U; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. **Arch Virol**, n.153, p.1621-1629, 2008.

MOYA, A; HOLMES, E C; GONZÁLEZ-CANDELAS, F. The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. **Nature Rev Microbiol**, n.2, p.279-288, 2004.

NAPTHINE, S; LEVER, R A; POWELL, M L; JACKSON, R J; BROWN, T D K; BRIERLEY, I. Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy. **PLoS One**, n.4 (12), e8390, p.1-10, 2009.

PARKIN, N T; CHAMORRO, M; VARMUS, H E. Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. **J Virol**, n.66 (8), p.5147-5151, 1992.

PEREIRA, H G; FIALHO, A M; FLEWETT, T H; TEIXEIRA, J M S; ANDRADE, Z P. Novel viruses in human faeces. **Lancet**, n.2 (8602), p.103–104, 1988a.

PEREIRA, H G; FLEWETT, T H; CANDEIAS, J A N; BARTH, O M. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. **J Gen Virol**, n.69 (Pt 11), p.2749–2754, 1988b.

PEREIRA, H G; DE ARAUJO, H P; FIALHO, A M; DE CASTRO, L; MONTEIRO, S P. A virus with bi-segmented double-stranded RNA genome in guinea pig intestines. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.84(1), p.137–140, 1989.

PONGSUWANNA, Y; TANIGUCHI, K; CHIWAKUL, M; URASAWA, T; WAKASUGI, F; JAYAVASU, C; URASAWA, S. Serological and genomic characterization of porcine rotaviruses in Thailand: detection of a G10 porcine rotavirus. **J Clin Microbiol**, n.34 (5), p.1050–1057, 1996.

POTGIETER, A C; PAGE, N A; LIEBENBERG, J; WRIGHT, I M; LANDT, O; VAN DIJK, A A. Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral dsRNA genomes. **J Gen Virol**, n.90 (6), p.1423-1432, 2009.

ROSEN, B I; FANG, Z Y; GLASS, R I; MONROE, S S. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. **Virology**, n.277 (2), p.316-329, 2000.

SAMMONS, D N; ADDANS, L D; MISHIKAWA, E E. Ultrasensitive silver base color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, n.2 (3), p.135-141, 1981.

SYMONDS, E M; GRIFFIN, D W; BREITBART, M. Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. **Appl Environ Microbiol**, n.5 (75), p.1402-1409, 2009.

VAN LEEUWEN, M; WILLIAMS, M M; KORAKA, P; SIMON, J H; SMITS, S L; OSTERHAUS, A D. Human picobirnaviruses identified by molecular screening of diarrhea samples. **J Clin Microbiol**, n.48 (5), p.1787-1794, 2010.

VANOPDENBOSCH, E; WELLEMANS, G. Birna-type virus in diarrhoeic calf faeces. **Vet Rec**, N.125 (24), P.610, 1989.

VICTORIA, J G; KAPOOR, A; LI, L; BLINKOVA, O; SLIKAS, B; WANG, C; NAEEM, A; ZAIDI, S; DELWART, E. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. **J Virol**, n.83 (9), p.4642-4651, 2009.

WAKUDA, M; PONGSUWANNA, Y; TANIGUCHI, K. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. **J Virol Meth**, n.126 (1-2), p.165-169, 2005.

WANG, Y; TU, X; HUMPHREY, C; McCCLURE, H; JIANG, X; OIN, C; GLASS, R I; JINAG, B. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. **J Med Primatol**, n.36, p.101-107, 2007.

YANG, H; MAKEYEV, E V; KANG, Z; JI, S; BAMFORD, D H; VANDIJK, A A. Cloning and sequence analysis of dsRNA segments 5, 6 and 7 of a novel non-group A,B,C adult rotavirus that caused an outbreak of gastroenteritis in China. **Virus Res**, n.106, p.15–26, 2004.

ZHANG, T; BREITBART, M; LEE, W H; RUN, J-Q; WEI, C L; SOH, S W L; HIBBERD, M L; LIU, E T; ROHWER, F; RUAN, Y. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. **PLoS Biol**, n.4 (1), p.108-118, 2006.



Of. CIBio/IB 24/2007

Cidade Universitária "Zeferino Vaz",
10 de dezembro de 2007.

Profa. Dra. CLARICE WEIS ARNS
Chefe do Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia - Unicamp

CÓPIA

Prezada Professora:

Informamos que o projeto abaixo relacionado, envolvendo OGM do tipo I, sob responsabilidade da **Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti**, protocolado sob o número **2007/06**, foi aprovado pela CIBio-IB/Unicamp na Reunião Ordinária de 10 de dezembro de 2007, para ser desenvolvido nas dependências do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp:

No. Projeto (data da aprovação)	Data de recepção	Nome do Projeto	Prazo para envio de relatório à CIBio
CIBio 2007/06 (10/12/2007)	07/11/2007	Caracterização genética de picobirnavírus detectados em amostras fecais de diferentes hospedeiros	agosto/2008

Recomendamos que sejam observadas as instruções normativas referentes transporte e contenção da OGMs, disponíveis na webpage da CTNBio <www.ctnbio.gov.br>.

Atenciosamente,

Cordiais Saudações,

Profa. Dra. **HELENA COUTINHO FRANCO DE OLIVEIRA**
Presidente da CIBio/IB-Unicamp

Cópia: Profa. Dra. Maria Silvia Viccari Gatti



Short communication

Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts

Maria Clara Duarte Fregolente^{a,*}, Erich de Castro-Dias^a, Sandra Soares Martins^a,
Fernando Rosado Spilki^b, Silmara Marques Allegratti^c, Maria Silvia Viccari Gatti^a

^a Department of Microbiology and Immunology, Institute of Biology, CP 6109, State University of Campinas – UNICAMP, Montetro Lobato, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

^b Institute of Health Sciences, Feevale University Center, 93352-000, Novo Hamburgo, RS, Brazil

^c Department of Parasitology, Institute of Biology, CP 6109, State University of Campinas – UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 November 2008

Received in revised form 7 March 2009

Accepted 9 March 2009

Available online 21 March 2009

Keywords:

Picobirnavirus
Genogroup I PBV
dsRNA virus
Snake
Dog
Pig

ABSTRACT

Picobirnaviruses (PBVs) have recently been classified into the *Picobirnaviridae* family. They are small, non-enveloped viruses with bisegmented, double-stranded (ds) RNA genomes. Although they are found in the feces of a broad range of hosts, information regarding their genomes is limited to viruses detected from humans, rabbits, and porcine. Identification of PBVs has been done using PAGE and reverse transcription PCR (RT-PCR). In this study, we present a phylogenetic analysis of PBVs detected in the feces of dogs, snakes, and rats. In addition, we compare these strains to those from human and porcine hosts. To do so, 487 fecal specimens from dogs, snakes and rats were analyzed by PAGE. The positive specimens for PBV were tested by RT-PCR using primers for genogroup I of the PBVs. From the 11 genogroup I PBV samples, at least one from each host was sequenced and submitted for phylogenetic analysis. All of the sequences showed high homology with the human and porcine genogroup I PBV sequences. In this study we report the first detection of PBVs in snakes (8.5%). We also report a phylogenetic analysis that goes beyond humans and pigs to include dogs, rats, and snakes. However, more hosts must be included in the analysis so that we may reach better conclusions regarding the spread of these viruses.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

Picobirnaviruses (PBVs) were recently classified as members of a new family of viruses *Picobirnaviridae* by ICTV (International Committee of Taxonomy of Virus). PBV are non-enveloped viruses measuring 35–40 nm in diameter with a bisegmented double-stranded RNA (dsRNA) genome. The larger segments of the genome range from 2.2 to 2.7 kbp and the smaller ones range from 1.2 to 1.9 kbp (Gatti et al., 1989). Segment 1 is believed to encode the putative capsid protein and segment 2 encodes a RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Rosen et al., 2000).

Although they are found in the feces of a broad range of mammalian hosts (Costa et al., 2004; Gallimore et al., 1993; Gatti et al., 1989; Pereira et al., 1988b, 1989), including wild animals kept in captivity (Haga et al., 1999; Masachessi et al., 2007; Wang et al., 2007), humans (Pereira et al., 1988a), and birds (Browning et al., 1991), genetic information about these viruses is limited to samples from humans (Rosen et al., 2000; Wakuda et al., 2005), rabbits (Green et al., 1999), and pigs (Bányai et al., 2008; Carruyo et al., 2008).

PBVs have been detected in feces from animals with or without diarrhea and sometimes have been associated with other enteric agents. However, they are still classified as opportunistic diarrheagenic pathogens and are not associated with a specific disease (Bányai et al., 2003; Bhattacharya et al., 2006, 2007; Gallimore et al., 1995; Rosen et al., 2000). Notably, PBVs have been reported to be associated with gastroenteritis in HIV-positive patients (Giordano et al., 1999; Grohmann et al., 1993).

Identification of PBVs has been accomplished using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and reverse transcription polymerase chain reactions (RT-PCR). In RT-PCR, primers from the small segment of human PBVs (Rosen et al., 2000) classify these viruses into genogroups I and II (Bányai et al., 2003). However, many stool samples positive for PBV by PAGE could not be amplified by these primers. This finding suggests that there is some genetic diversity among these viruses (Giordano et al., 2008). Moreover, phylogenetic analyses have revealed a high degree of identity in the nucleotide and amino acid sequences compared to human and porcine genogroup I PBVs (Bányai et al., 2008; Carruyo et al., 2008).

In this study, we report the detection and partial molecular characterization of PBV from the feces of dogs, snakes and rats.

A total of 487 stool samples that did not show any signs of diarrhea were analyzed by PAGE. From this total, 349 were from domestic dogs (*Canis familiaris*), 56 were from captive Wistar rats (*Rattus norvegicus*) and 82 were from captive snakes. The snake stool

* Corresponding author. Tel.: +55 19 35216269; fax: +55 19 35216276.

E-mail addresses: mclarad@unicamp.br, mariaclarad@yahoo.com.br (M.C.D. Fregolente), eri_castro2002@yahoo.com.br (E. de Castro-Dias), smartins@unicamp.br (S.S. Martins), fernandors@fevale.br (F.R. Spilki), sallegre@unicamp.br (S.M. Allegratti), msvgatti@unicamp.br (M.S.V. Gatti).

samples were from tropical rattlesnakes (*Crotalus durissus*), common lancehead (*Bothrops atrox*), jararaca (*Bothrops jararaca*), urutu (*Bothrops alternatus*) and Brazilian lancehead snakes (*Bothrops moojeni*). The samples were resuspended in 10–20% phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2). dsRNA was extracted with phenol:chloroform (1:1) and precipitated with ethanol (Pereira et al., 1988b). The precipitates were subjected to 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining according to Herring et al. (1982).

For the genotyping of PBVs, dsRNA from samples positive for PBVs by PAGE were extracted using the TRIzol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). The final precipitate was resuspended in 30 µL DEPC-treated sterile distilled water and stored at –20 °C.

RT-PCR was carried out using the primers PicoB25 (TGTTGTG-GATGTTTC) and PicoB43 (A(GA)TG(CT)TGTCGAACCTT), described by Rosen et al. (2000). These primers are based on the sequence of RdRp, resulting in an amplicon of ~200 bp in length that is used to determine if the sample belongs to genogroup I of the PBVs. The total extracted RNA (10 µL volume) was added to RT solution (10–100 ng/reaction). The composition of the RT reaction mixture (total volume: 25 µL) was as follows: RT buffer, DTT (10 mM), DMSO (7%), dNTP mix (20 µM), 2 pmol of each primer, and 100 U of MMLV-RT. All the reagents used were from Invitrogen, except for the DMSO (Riedel-deHaën). The RNA was denatured at 94 °C for 5 min and immediately chilled in a cool ice bath. RT was performed at 37 °C for 50 min.

PCR was carried out using 1× PCR buffer, 50 µM dNTP mix, 2 mM MgCl₂, 5 pmol of the PicoB25 primer, 5 pmol of the PicoB43 primer, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Fermentas). The final volume of the PCR reaction was 50 µL. RNA-cDNA was denatured at 94 °C for 2 min. Amplification continued for 30 cycles with denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 52 °C for 1 min, elongation at 72 °C for 1 min, and a single incubation at 72 °C for 7 min.

At least one amplicon from each host was selected for sequencing. The Big Dye cycle sequencing kit (Applied Biosystems) was used with the primers from the RT-PCR. The chromatograms were obtained using a 3700 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

The sequence data obtained were edited and aligned using the programs Pregap4, Gap4 (Staden Package), and a BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.9.0). The data were compared with reference sequences in the GenBank database using the BLAST program. Phylogenetic analysis was performed using the MEGA4 program (Tamura et al., 2007) with the Neighbor-Joining method and Kimura-2 parameter.

A total of 24 (4.9%) of the analyzed samples were positive for PBVs by PAGE (Table 1). 11 of the samples were also positive by RT-PCR using the PicoB25 and PicoB43 primers. Of the total dog samples, 0.86% (*n* = 3) were positive by PAGE and two were positive by RT-PCR. For the snakes, 8.5% (*n* = 7) of the samples were positive by PAGE and two were classified into genogroup I. For the rats, 25% (*n* = 14) were positive by PAGE and seven were positive by RT-PCR. Six samples were submitted for sequencing. The sam-

ples were named rat|BR-01|BRA|2006, rat|BR-02|BRA|2006, and rat|BR-03|BRA|2006 for the rat host and dog|BR-01|BRA|2004 and dog|BR-02|BRA|2004 for the dog host. The snake host sample, from *C. durissus*, was named snake|BR-01|BRA|2006.

All of the sequences obtained (GenBank accession no. EU814970, EU814971, EU814972, EU814973, FJ164031, and FJ164032) showed average to high sequence identity with human and porcine genogroup I PBV sequences. The identity values varied from 66 to 84% (data not shown).

rat|BR-01|BRA|2006 showed 77% identity with rat|BR-02|BRA|2006 and 92% identity with rat|BR-03|BRA|2006. rat|BR-02|BRA|2006 and rat|BR-03|BRA|2006 were 77% identical. Thus, these three strains belong to the same branch with the highest bootstrap value in the phylogenetic tree (Fig. 1). snake|BR-01|BRA|2006 showed 73% identity with the rat rat|BR-02|BRA|2006, which was the highest value obtained between two hosts. Dog samples were 41% identical, and dog|BR-01|BRA|2004 was the most diverse sequence obtained. This strain was the most external that we obtained, despite the fact that the rat branch was distant from the other two sequences. The dog|BR-02|BRA|2004 strain was closely related to the human genogroup I PBV 1-CHN-97 (69% identity). The rat branch was close to 104-FL-94. All of the rat genogroup I PBV sequences showed more than 70% of identity with this human genogroup I PBV sample.

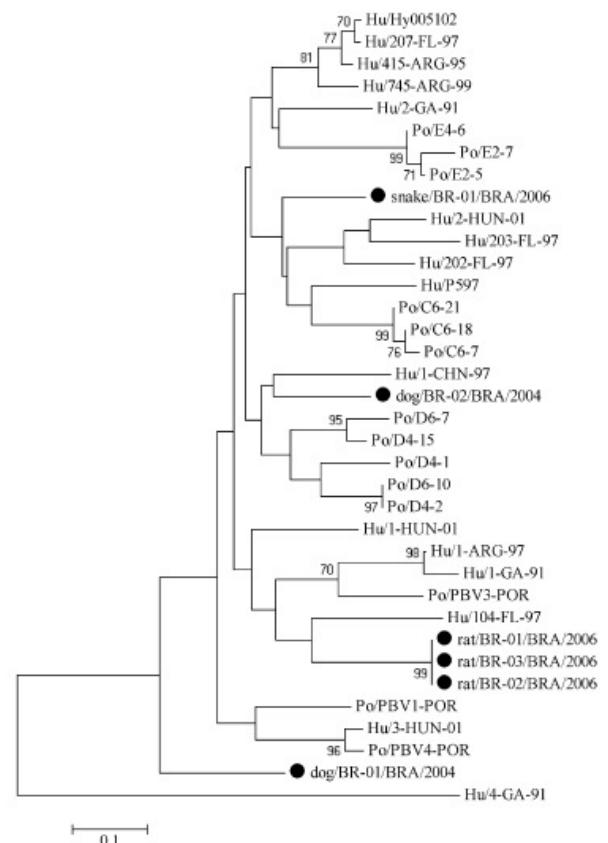


Fig. 1. Phylogenetic relationships between genogroup I picobirnavirus strains based on nucleotide sequences. Human and porcine strains are indicated by the prefixes "Hu" and "Po", respectively. The sequences for this study are indicated by ●. Strain 4-GA-91 (genogroup II) was used as an out-group. The tree was inferred by the MEGA4 program using the Neighbor-Joining method with the evolutionary distances computed by the Kimura-2 parameter method. Bootstrap values above 70% are indicated. Bars are in units of substitution per nucleotide.

Table 1
Detection of PBV in stool samples from dogs, rats and snakes. Only the positive samples were tested by RT-PCR.

Host	No. of positive/total samples analyzed	% Identification	PAGE-positive	
			RT-PCR-positive	RT-PCR-negative
Dog	3/349	0.86	2	1
Snake	7/82	8.5	2	5
Rat	14/56	25	7	7
Total	24/487	4.9	11	13

The detection limit of PBVs by PAGE has been estimated to be around 0.09% in children (Giordano et al., 2008) and between 11.1 and 27% in pigs (Carruyo et al., 2008; Gatti et al., 1989; Ludert et al., 1991). Detection rates less than 10% by PAGE are typical for this virus because of the low concentration of the particles in the feces and the relative insensitivity of this technique (Masachessi et al., 2007). We identified rates similar to those in the literature, which vary from 0.86% in dogs to 25% in rats. Snakes were identified as a new host for PBVs. In snakes, 8.5% of all examined samples were positive.

In this study we showed the identification of PBVs in dogs and rats using both PAGE and RT-PCR. We further confirmed our data with nucleotide sequencing. The presence of genogroup I PBVs in dogs, snakes, and rats demonstrates that the same PBV genogroup can circulate between different hosts. These findings suggest that the genogroup type does not restrict the host specificity. This was also observed in recent studies with pigs (Bányai et al., 2008; Carruyo et al., 2008).

Overall, 24 (4.9% of the total) samples were positive for PBVs by PAGE. In the group, 45.8% were positive for genogroup I PBVs by RT-PCR. The negative samples in RT-PCR for genogroup I PBV were tested for genogroup II using the PicoB25 and PicoB43 primers. However, we obtained no conclusive results (data not shown). Positive samples for PBV in PAGE that were not successfully amplified with these two sets of primers were also observed by other authors (Bhattacharya et al., 2006; Martínez et al., 2003). These data suggest that negative samples may belong to another genogroup that could be determined with new, more specific primers.

In our study, the PBV sequences from rats, dogs and snakes were compared to sequences from human PBVs. The comparison revealed many similarities. The values of identity were higher between the three sequences of PBV from rats than the others hosts. These data are similar to those obtained by Bányai et al. (2008) and Carruyo et al. (2008). Carruyo et al. (2008) showed that the porcine clone PBV1-POR was 77% identical to human 1-CHN-97. This human strain was also similar to the dog strain dog|BR-02|BRA|2004. The highest identity for PBV was observed between a strain from the rat and a strain from the snake. The snakes were maintained in captivity and were fed a diet of rats. This situation supports the hypothesis that PBVs can be spread from rats to snakes by feeding. Another hypothesis is that the viruses can only infect the rats. Instead, the snakes simply are a carrier of the virus, but cannot be infected by the virus (Pereira et al., 1988b).

Our phylogenetic study shows that the strain dog|BR-02|BRA|2004 and the three strains from rats showed sequences closely related to human PBV. Also, human strain 3-HUN-01 and porcine strain PBV4-POR belong to the same branch. This finding is similar to that of Carruyo et al. (2008). Closely related PBVs can be identified in different hosts. This finding suggests that these viruses can co-circulate in a variety of animals, including humans. Furthermore, there is no specificity between the genogroup of PBVs and the hosts. More studies of other hosts are necessary to establish a deeper understanding of the spread of these viruses.

In this work, we identified snakes as a new host for PBVs. Furthermore, sequences obtained from dogs, snakes, and rats allowed us to conduct the first phylogenetic analysis of hosts other than humans and pigs.

Acknowledgements

We would like to thank FAPESP (process number 2005/04417-7) for their financial support of this study and Professor Márcio José da Silva for assistance with sequencing.

References

- Bányai, K., Jakab, F., Reuter, G., Bene, J., Uj, M., Meleg, B., Szűcs, G., 2003. Sequence heterogeneity among human picobirnaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. *Arch. Virol.* 148, 2281–2291.
- Bányai, K., Martella, V., Bogdán, Á., Forgách, P., Jakab, F., Meleg, E., Bíró, H., Meleg, B., Szűcs, G., 2008. Genogroup I picobirnaviruses in pig: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. *J. Gen. Virol.* 89, 534–539.
- Bhattacharya, R., Sahoo, G.C., Nayak, M.K., Saha, D.R., Sur, D., Naik, T.N., Bhattacharya, S.K., Krishnan, T., 2006. Molecular epidemiology of human picobirnaviruses among children of a slum community in Kolkata, India. *Infect. Genet. Evol.* 6, 453–458.
- Bhattacharya, R., Sahoo, G.C., Nayak, M.K., Rajendran, K., Dutta, P., Mitra, U., Bhattacharya, M.K., Naik, T.N., Bhattacharya, S.K., Krishnan, T., 2007. Detection of genogroup I and II human picobirnaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. *Infect. Genet. Evol.* 7, 229–238.
- Browning, G.F., Chalmers, R.M., Snodgrass, D.R., Batt, R.M., Hart, C.A., Ormarod, S.E., Leadon, D., Stoneham, S.J., Rosedale, P.D., 1991. The prevalence of enteric pathogens in diarrhoeic thoroughbred foals in Britain and Ireland. *Equine Vet. J.* 23, 405–409.
- Carruyo, G.M., Mateu, G., Martínez, L.C., Pujol, F.H., Nates, S.V., Liprandi, F., Ludert, J.E., 2008. Molecular characterization of porcine picobirnaviruses and development of a specific reverse transcription-PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2402–2405.
- Costa, A.P., Cubel Garcia, R.C.N., Labarthe, N.V., Leite, J.P.G., 2004. Detection of double-stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 554–557.
- Gallimore, C., Lewis, D., Brown, D., 1993. Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. *Arch. Virol.* 133, 63–73.
- Gallimore, C.I., Green, J., Casemore, D.P., Brown, D.W.G., 1995. Detection of a picobirnavirus associated with *Cryptosporidium* positive stools from humans. *Arch. Virol.* 140, 1275–1278.
- Gatti, M.S.V., Pestana de Castro, A.F., Ferraz, M.M.G., Fialho, A.M., Pereira, H.G., 1989. Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. *Res. Vet. Sci.* 47, 397–398.
- Giordano, M.O., Martínez, L.C., Rinaldi, D., Espul, C., Martínez, N., Isa, M.B., Depetris, A.R., Medet, S.I., Nates, S.V., 1999. Diarrhea and enteric emerging viruses in HIV-infected patients. *AIDS Res. Hum. Retrov.* 15, 1427–1432.
- Giordano, M.O., Masachessi, G., Martínez, L.C., Barril, P.A., Ferreyra, L.J., Isa, M.B., Nates, S.V., 2008. Two instances of large genome profile picobirnavirus occurrence in Argentinian infants with diarrhea over a 26-year period (1977–2002). *J. Infect.* 56, 371–375.
- Green, J., Gallimore, C.I., Clewley, J.P., Brown, D.W.G., 1999. Genomic characterisation of the large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobirnavirus of *Cryptosporidium parvum*. *Arch. Virol.* 144, 2457–2465.
- Grohmann, G.S., Glass, R.I., Pereira, H.G., Monroe, S.S., Hightower, A.W., Weber, R., Bryan, R.T., 1993. Enteric viruses and diarrhea in HIV-infected patients. *N. Engl. J. Med.* 329, 14–20.
- Haga, I.R., Martins, S.S., Hosomi, S.T., Vicentini, F., Tanaka, H., Gatti, M.S.V., 1999. Identification of a bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) in faeces of giant anteaters (*Myrmecophaga tridactyla*). *Vet. J.* 158, 234–236.
- Herring, A.J., Inglis, N.F., Ojen, C.K., Snodgrass, D.R., Menezies, J.D., 1982. Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection on viral nucleic acid in silver stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 29, 473–477.
- Ludert, J.E., Hidalgo, M., Gil, F., Liprandi, F., 1991. Identification in porcine faeces of a novel virus with a bisegmented double stranded RNA genome. *Arch. Virol.* 117, 97–107.
- Martínez, L.C., Giordano, M.O., Isa, M.B., Alvarado, L.F., Paván, J.V., Rinaldi, D., Nates, S.V., 2003. Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobirnavirus. *Intervirology* 46, 207–213.
- Masachessi, G., Martínez, L.C., Giordano, M.O., Barril, P.A., Isa, M.B., Ferreyra, L., Villalón, D., Carello, M., Asis, C., Nates, S.V., 2007. Picobirnavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. *Arch. Virol.* 152, 989–998.
- Pereira, H.G., Fialho, A.M., Flewett, T.H., Teixeira, J.M.S., Andrade, Z.P., 1988a. Novel viruses in human faeces. *Lancet* 2, 103–104.
- Pereira, H.G., Flewett, T.H., Candeias, J.A.N., Barth, O.M., 1988b. A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. *J. Gen. Virol.* 69, 2749–2754.
- Pereira, H.G., De Araujo, H.P., Fialho, A.M., De Castro, L., Monteiro, S.P., 1989. A virus with bi-segmented double-stranded RNA genome in guinea pig intestines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 137–140.
- Rosen, B.I., Fang, Z.Y., Glass, R.I., Monroe, S.S., 2000. Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology* 277, 316–329.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Wakuda, M., Pongsuwanna, Y., Taniguchi, K., 2005. Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobirnavirus. *J. Virol. Methods* 126, 165–169.
- Wang, Y., Tu, X., Humphrey, C., McClure, H., Jiang, X., Qin, C., Glass, R.I., Jiang, B., 2007. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. *J. Med. Primatol.* 36, 101–107.

Nomenclature proposal for picobirnavirus

Maria Clara Duarte Fregolente ·
 Maria Silvia Viccari Gatti

Received: 17 August 2009 / Accepted: 30 September 2009 / Published online: 31 October 2009
 © Springer-Verlag 2009

Abstract Picobirnaviruses have been identified in the feces of a broad range of hosts by several international research groups. Because there is no standard nomenclature for these viruses, we propose a clear and unique name for each strain.

Introduction

The new viral family *Picobirnaviridae* is composed of only one viral genus, *Picobirnavirus*. The species in this genus are *Human picobirnavirus* and *Rabbit picobirnavirus*, and the first is designated as a type species [5]. The name of the virus was proposed based on its characteristics: the prefix *pico* denotes the small diameter of the viral particle (35 nm), and *birna* indicates a genome composed of two segments of double-stranded RNA (dsRNA) [16]. The large segment encodes a capsid precursor that self-assembles to form a single-shell capsid [7], and the small segment encodes the RNA-dependent-RNA polymerase (RdRp) [18].

Picobirnavirus (PBV) was accidentally discovered in human and rat feces by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) [16, 17]. Since then, these viruses have been found in a great number of vertebrate hosts [8–10, 12, 13, 15]. The large segment of the genome of rabbit PBV was first sequenced ten years after the virus's discovery [11], and

recently, it has been suggested that PBV may exist as a quasispecies [2].

Since this first sequencing event, 320 sequences have been submitted to the GenBank database [1–4, 6, 8, 11, 12, 14, 18–21], but the nomenclature for PBV strains has not yet been standardized. From this total, only seven are complete sequences, five from the large segment and two from the small one. Partial sequences based on RdRp are better characterized. Now that research on the molecular biology and genetics of PBV is progressing around the world, a unique and clear nomenclature for its strains would be useful to the scientific community. Here, we propose a nomenclature for each strain of PBV.

Suggestions for a uniform nomenclature for picobirnavirus

The nomenclature proposed here is based on the PBV host, the country and the year of identification. The host is the animal from which the original specimen containing the PBV strain was obtained. The common name of the host animal should be specified. The country of origin should be written as a three-letter code (ISO 3166-1 alpha3), and the year of identification should be given as a four-digit number. If more than one strain is obtained from the same host in a single year, a number should be provided after the country name.

For example, specimen 7, which was obtained from a pig in Brazil in 2006, was found to be positive for PBV via PAGE. The name of this PBV strain should thus be PBV/pig/BRA-07/2006.

There are genogroups determined for PBV by the primer pairs used in reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Genogroup I is defined by the pair PicoB25

M. C. D. Fregolente (✉) · M. S. V. Gatti
 Department of Microbiology and Immunology,
 Institute of Biology, State University of Campinas,
 UNICAMP, CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil
 e-mail: mclaradf@unicamp.br; mariaclaradf@yahoo.com.br

M. S. V. Gatti
 e-mail: msvgatti@unicamp.br

Table 1 Primer sequences for PBV identification and genogroup definition [1, 18]

Primer identification	Reference strain	Polarity	Position (nucleotide)	Sequence (5'–3')	Genogroup
PicoB25	1-CHN-97	+	665–679	TGG TGT GGA TGT TTC	Genogroup I
PicoB43		–	850–865	A(GA)T G(CT)T GGT CGA ACT T	
PicoB23	4-GA-91	+	685–699	CGG TAT GGA TGT TTC	Genogroup II
PicoB24		–	1039–1053	AAG CGA GCC CAT GTA	

and PicoB43, while the pair PicoB23 and PicoB24 determines genogroup II (Table 1) [1, 18]. These primers pairs were designed from the small segment from human PBV, based on the sequence of the RdRp [18]. When RT-PCR results are available, the PBV genogroup should be identified before the strain name using GI or GII for genogroup I and II, respectively. In this case, using the same example explained above, if that strain was positive in RT-PCR with primers PicoB25 and PicoB43, the name of this PBV strain should thus be GI strain PBV/pig/BRA-07/2006. PBVs that are not amplified by these described primer pairs should be identified as non-I and non-II. In the future, if other genogroups are determined using newly designed primers, the present order of genogroup numbers should be maintained.

This proposal is intended to standardize PBV nomenclature in order to facilitate future comparative studies.

References

- Bányai K, Jakab F, Reuter G, Bene J, Új M, Melegh B, Szűcs G (2003) Sequence heterogeneity among human picobimaviruses detected in a gastroenteritis outbreak. *Arch Virol* 148:2281–2291
- Bányai K, Martella V, Bogdán Á, Forgách P, Jakab F, Meleg E, Bíró H, Melegh B, Szűcs G (2008) Genogroup I picobimaviruses in pig: evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. *J Gen Virol* 89:534–539
- Bhattacharya R, Sahoo GC, Nayak MK, Saha DR, Sur D, Naik TN, Bhattacharya SK, Krishnan T (2006) Molecular epidemiology of human picobimaviruses among children of a slum community in Kolkata, India. *Infect Genet Evol* 6:453–458
- Bhattacharya R, Sahoo GC, Nayak MK, Rajendran K, Dutta P, Mitra U, Bhattacharya MK, Naik TN, Bhattacharya SK, Krishnan T (2007) Detection of Genogroup I and II human picobimaviruses showing small genomic RNA profile causing acute watery diarrhoea among children in Kolkata, India. *Infect Genet Evol* 7:229–238
- Bernard D (2005) DanforthCenter. <http://www.danforthcenter.org/iltab/ictvnet/asp/iPublicMessageBoardMain.asp?Topic=5&MID=0&click=Vertebrate>
- Carruyo GM, Mateu G, Martinez LC, Pujol FH, Nates SV, Liprandi F, Ludert JE (2008) Molecular characterization of porcine picobimaviruses and development of a specific reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* 46:2402–2405
- Duquerroy S, Da Costa B, Henry C, Vigouroux A, Libersou S, Lepault J, Navaza J, Delmas B, Rey FA (2009) The picobirnavirus crystal structure provides functional insights into virion assembly and cell entry. *EMBO J* 28(11):1655–1665. doi: 10.1038/emboj.2009.109
- Fregolente MCD, De Castro-Dias E, Martins SS, Spilki FR, Allegretti SM, Gatti MSV (2009) Molecular characterization of picobimavirus from new hosts. *Virus Res* 143:134–136
- Gallimore C, Lewis D, Brown D (1993) Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. *Arch Virol* 133:63–73
- Gatti MS, Pestana De Castro AF, Ferraz MMG, Fialho AM, Pereira HG (1989) Viruses with bisegmented double-stranded RNA in pig faeces. *Res Vet Sci* 47:397–398
- Green J, Gallimore CI, Clewley JP, Brown DWG (1999) Genomic characterisation of the large segment of a rabbit picobirnavirus and comparison with the atypical picobimavirus of *Cryptosporidium parvum*. *Arch Virol* 144:2457–2465
- Ghosh S, Kobayashi N (2009) Complete nucleotide sequence of gene segment 2 of bovine picobimavirus strain RUBV-P J. *Gen Virol* (in press)
- Leite JPG, Monteiro SP, Fialho AM, Pereira HG (1990) A novel avian virus with trisegmented double-stranded RNA and further observations on previously described similar viruses with bisegmented genome. *Virus Res* 16:119–126
- Martinez LC, Giordano MO, Isa MB, Alvarado LF, Pavan JV, Rinaldi D, Nates SV (2003) Molecular diversity of partial-length genomic segment 2 of human picobimavirus. *Intervirology* 46:207–213
- Masachessi G, Martinez LC, Giordano MO, Barril PA, Isa BM, Ferreyra L, Villareal D, Carello M, Asis C, Nates SV (2007) Picobimavirus (PBV) natural hosts in captivity and virus excretion pattern in infected animals. *Arch Virol* 152:989–998
- Pereira HG, Fialho AM, Flewett TH, Teixeira JMS, Andrade ZP (1988) Novel viruses in human faeces. *Lancet* 2:103–104
- Pereira HG, Flewett TH, Candeias JAN, Barth OM (1988) A virus with a bisegmented double-stranded RNA genome in rat (*Oryzomys nigripes*) intestines. *J Gen Virol* 69:2749–2754
- Rosen BI, Fang ZY, Glass RI, Monroe SS (2000) Cloning of human picobimavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology* 277:316–329
- Symonds EM, Griffin DW, Breitbart M (2009) Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Appl Environ Microbiol* 75:1402–1409
- Wakuda M, Pongsuwanna Y, Taniguchi K (2005) Complete nucleotide sequences of two RNA segments of human picobimavirus. *J Virol Methods* 126:165–169
- Zhang T, Breitbart M, Lee WH, Run JQ, Wei CL, Soh SW, Hibberd ML, Liu ET, Rohwer F, Ruan Y (2006) RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. *PLoS Biol* 4:E3