



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

MONIQUE ARAÚJO LUZ

PESQUISA DE ROTAVÍRUS EM AVES SILVESTRES DA REGIÃO
AMAZÔNICA MANTIDAS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ

BELÉM – PA
2012



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

MONIQUE ARAÚJO LUZ

PESQUISA DE ROTAVÍRUS EM AVES SILVESTRES DA REGIÃO
AMAZÔNICA MANTIDAS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como exigência do Curso de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Joana D'Arc Pereira Mascarenhas

BELÉM – PA
2012

Luz, Monique Araújo

Determinação da presença de hemogregarina em boideos mantidos em cativeiro no Estado do Pará. / Monique Araújo Luz . _ Belém, 2008.

f. : il.

Monografia (Bacharelado Medicina Veterinária) –
Universidade Federal Rural da Amazônia, 2008.

1.Hemoparasitos 2. Hemogregarina 3. Répteis 4. Serpentes 5.
Cativeiro I. Título

CDD – 636.9089696



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA
AMAZÔNIA

MONIQUE ARAÚJO LUZ

PESQUISA DE ROTAVÍRUS EM AVES SILVESTRES DA REGIÃO
AMAZÔNICA MANTIDAS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia: área de concentração Saúde e Meio Ambiente, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA EM: / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses - Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri - 1º Examinador
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA

Profª. Drª. Ana Silvia Sardinha Ribeiro- 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Profª Drª Andréa Maria Góes Negrão- 3º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre se fazer presente em minha vida, me guiando e me dando forças para seguir em frente.

Aos meus pais, Miguel Tadeu Lopes Luz e Bolivan Mendes Araújo, e meus irmãos, Michelle Araújo Luz e Julio Thadeu Araújo Luz, por mesmo de longe me darem todo apoio e incentivo na minha formação.

Ao meu namorado, companheiro e amigo, João Paulo Borges de Loureiro, por todo amor, carinho e dedicação e por todas as palavras de força que me foram dadas quando eu mais precisei.

A todos meus amigos que sempre estiveram presentes, mesmo quando ausentes, e que sempre me proporcionaram momentos de alegria e de descontração.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andre Marcelo C. Meneses, pelos anos de orientação e pela imensa contribuição em minha formação profissional.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica – HOVET/UFRA, em especial as amigas Larissa Seixas, Renata Bastos, Amanda Danin, Dinaiara Fragoso e Nívia M. Freitas por disponibilizarem seu tempo e ajudarem no andamento do projeto.

Aos meus colegas de mestrado, em especial as amigas Eliane Lima e Gilmar Abreu por sempre estarem por perto e pelas boas risadas que demos juntas.

A Dra. Joana D'arc Mascarenhas pela imensa contribuição na pesquisa, oferecendo seus conhecimentos e disponibilizando seu laboratório para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do laboratório de Rotavírus do Instituto Evandro Chagas, em especial a Delana Bezerra e René Silva, pela imensa ajuda ofertada.

Ao Jardim Zoobotânico da Amazônia Bosque Rodrigues Alves; Parque Ecológico Mangal das Garças; Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), Bioparque Amazônia Crocodilo Safari e Fazenda Paricuiã, pelo espaço concedido, em especial a Stefânia Miranda e Aline Imbeloni, pela extrema paciência e dedicação.

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo identificar a presença de rotavírus em aves silvestres mantidas em cativeiro no Estado do Pará, bem como, investigar os grupos de rotavírus circulantes nos espécimes fecais dessas aves, caracterizar os eletroferotipos dos rotavírus encontrados e investigar especificamente a presença de rotavírus dos grupos A e D nos espécimes fecais. Amostras fecais foram coletadas na Fazenda Paricuiã (Terra Alta/PA), no Jardim Zoobotânico da Amazônia Bosque Rodrigues Alves, Parque Ecológico Mangal das Garças, Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e Bioparque Amazônia Crocodilo Safari em Belém/Pará, Brasil, no período compreendido entre março de 2011 e fevereiro de 2012. Foram coletadas 83 amostras fecais de aves pertencentes às ordens: Psittaciformes (família Psittacidae), Ciconiformes (famílias Ardeidae e Threskiornithidae) e Falconiformes (família Accipitridae). A partir das amostras coletadas foram preparadas suspensões fecais, com posterior extração do dsRNA viral, que foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). A reação em cadeia mediada pela polimerase e precedida de transcrição reversa (RT-PCR) foi realizada com iniciadores específicos para a amplificação do gene NSP4 de rotavírus A e VP6 de rotavírus D. Todas as amostras foram negativas tanto por EGPA quanto por RT-PCR, necessitando, no entanto, de mais estudos que visem à detecção dos rotavírus em aves silvestres e que contribuam com o conhecimento acerca do papel dessas espécies na epidemiologia da doença.

Palavras-chaves: rotavírus; aves silvestres; cativeiro; RT-PCR; EGPA

ABSTRACT

The present study aims to identify the presence of rotavirus in wild birds kept in captivity in Pará State (PA), as well as investigate rotavirus circulating groups in fecal specimens of these birds, to characterize the rotavirus electropherotypes found, and specifically investigate the presence of groups A and D rotavirus in fecal specimens. Fecal samples were collected at the “Fazenda Paricuiã” (Terra Alta-PA), “Jardim Zoobotânico da Amazônia Bosque Rodrigues Alves”; “Parque Ecológico Mangal das Garças” and “Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG)” at Belém/Pará State/Brazil, in the period between March 2011 and February 2012. We collected fecal samples from 83 birds belonging to the orders: Psittaciformes (Psittacidae family), Ciconiformes (Ardeidae and Threskiornithidae family) and Falconiformes (Accipitridae family). Fecal suspensions were prepared from the samples collected, with subsequent extraction of viral dsRNA, which was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The chain reaction mediated polymerase and reverse transcription (RT-PCR) was performed with primers specific for amplification of the NSP4 gene of A rotavirus and VP6 of D rotavirus. All samples were negative by both EGPA and by RT-PCR, requiring, however, further studies aimed at detection of rotavirus in wild birds and contribute to knowledge about the role of these species in the epidemiology of the disease.

Key words: rotavirus; wild birds; captivity; RT-PCR, PAGE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Alguns dos principais representantes da família Psittacidae: **(A)** Arara macao ou araracanga (*Ara macao*), **(B)** Papagaio do mangue (*Amazona amazonica*). 16
- Figura 2.** **(A)** Representantes da família Threskiornithidae: Guarás (*Eudocimus ruber*) (coloração vermelha) e Colhereiros (*Platalea ajaja*) (coloração rosa). **(B)** Principal representante da família Ardeidae: Garça-branca-grande (*Ardea alba*). 18
- Figura 3.** **(A)** Gavião-real (*Harpia harpyja*) e **(B)** Gavião-carrapateiro (*Mivalgo chimachima*), representantes da família Accipitridae. 19
- Figura 4.** Eletromicrografia de partículas do RV, provenientes de um filtrado das fezes de uma criança com gastroenterite. 20
- Figura 5.** Demonstração da estrutura tridimensional de rotavírus, com o capsídeo externo em amarelo, o intermediário em azul e o interno (core) em verde. 21
- Figura 6.** Estrutura do genoma dos rotavírus representado por um dos 11 segmentos de RNA. 21
- Figura 7.** **(Esquerda)** Migração dos segmentos genômicos (dsRNA) da cepa Sa11 (Rotavírus A), pela eletroforese em gel de poliacrilamida. **(Centro)** Proteínas codificadas por cada segmento. **(Direita)** Ilustração simplificada de uma partícula vírica e os seus componentes. 22
- Figura 8.** Demonstração do perfil eletroforético de rotavírus A de mamíferos e de rotavírus A e D de aves, através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. 27
- Figura 9.** Esquema representativo do ciclo de replicação dos rotavírus em uma célula infectada. Após a entrada do vírus na célula, inicia-se a transcrição dos mRNAs, dos RNAs genômicos e a síntese das proteínas, que são direcionados para viroplasmas e, posteriormente, para o retículo endoplasmático rugoso (RER), adquirindo um envelope transitório. A liberação das partículas ocorre por lise celular. 32
- Figura 10.** Demonstração das gaiolas das aves silvestres, temporariamente forradas com papel alumínio, até que se obtivessem as amostras fecais. **(A)** Coleta de “pool” de fezes. **(B)** Coleta de amostra individual. 62
- Figura 11.** Acondicionamento de amostra fecal de aves silvestres em tubo criogênico, para posterior envio ao local de processamento. 62

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1. Localização e função das proteínas dos rotavírus	23
Tabela 1. Primers utilizados para os genes que codificam as proteínas VP6 de rotavírus D e NSP4 de rotavírus A.	56
Tabela 2. Total de amostras fecais coletadas de aves mantidas em cativeiro no Estado do Pará, discriminando-se o número de amostras individuais e de pools de espécimes fecais coletados de ordem e família.	56
Quadro 2. Reagentes utilizados para o preparo de gel de poliacrilamida.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

As- Ácido siálico

cDNA - DNA complementar

DLP - Partículas de dupla camada

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DSR- Dimorfismo sexual reverso

dsRNA - Ácido ribonucléico de dupla cadeia

EGPA - Eletroforese em gel de poliacrilamida

EIA- Ensaio imunoenzimático

IEC -Instituto Evandro Chagas

mA - Milli-Âmperes

MAbs- Anticorpos monoclonais

ME- Microscopia eletrônica

mg – Miligrama

mL – Mililitro

μL – Microlitro

nm – Nanômetros

NSP – Proteína não estrutural

ORF - Open Reading Frame (fase aberta de leitura)

pb – Pares de bases

PBS- Solução salina tamponada com fosfato

RER- Retículo endoplasmático rugoso

RNAm - RNA mensageiro

rpm - Rotações por minuto

RT-PCR - Reação em cadeia mediada pela polimerase, precedida de transcrição Reversa

RV – Rotavírus

SG - Subgrupo

TBE - Tampão tris-borato-EDTA

TR- Transcriptase reversa

V – Volts

VIP- Viroplasma

VP – Proteína estrutural

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	6
LISTA DE TABELAS E QUADROS	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	8
1 CONTEXTUALIZAÇÃO	11
1.1. OBJETIVOS	12
1.1.1. Geral	12
1.1.2. Específicos	12
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	14
1.2.1. Aves Silvestres	14
1.2.1.1. Psittaciformes	15
1.2.1.2. Ciconiiformes	16
1.2.1.3. Falconiformes	18
1.2.2. Rotavírus	20
1.2.2.1. Estrutura	20
1.2.2.2. Classificação	24
1.2.2.3. Perfil Eletroforético	26
1.2.2.4. Características físico-químicas	28
1.2.2.5. Transmissão e Sinais clínicos	28
1.2.2.6. Transcrição e replicação	29
1.2.2.7. Diagnóstico	32
1.2.2.8. Epidemiologia	33
REFERÊNCIAS	36
2. PESQUISA DE ROTAVÍRUS EM AVES SILVESTRES DA REGIÃO AMAZÔNICA MANTIDAS EM CATIVEIRO NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL	43

ABSTRACT	43
RESUMO	44
2.1. INTRODUÇÃO	44
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.2.1 Coleta de amostras fecais	45
2.2.2. Suspensões fecais	45
2.2.3. Extração do genoma viral	46
2.2.4.. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)	46
2.2.5. Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR)	46
2.2.6. Eletroforese em Gel de Agarose	47
2.3. RESULTADOS	47
2.4. DISCUSSÃO	48
2.5. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	53
ANEXOS	57

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Uma grande variedade de agentes infecciosos pode afetar as aves, especialmente o trato gastrintestinal. Dentre esses agentes estão bactérias, protozoários e vírus, atuando de forma isolada ou em associação (ALFIERI et al., 2000).

Com relação à etiologia viral, vários gêneros têm sido isolados a partir de aves com enteropatias e/ou clinicamente saudáveis, os mais comuns são os rotavírus, coronavírus, enterovírus, adenovírus, astrovírus e reovírus (GUY, 1998; ALFIERI et al., 2000).

São patógenos que podem se comportar como oportunistas ou como agentes primários de doença, dependendo da cepa do agente infectante, do estado nutricional e grau de imunidade da ave acometida e de condições ambientais que favoreçam sua transmissão (GODOY & CUBAS, 2011).

Os rotavírus (RV) encontram-se amplamente disseminados na natureza e são reconhecidamente os agentes virais mais importantes associados à doença entérica em grande variedade de espécies de aves e mamíferos, incluindo seres humanos (GUY, 1998; ALFIERI et al., 2000; VRANJAC, 2004).

A primeira detecção desses agentes em aves foi realizada em 1977, por Bergeland e colaboradores, em perus jovens com diarreia nos Estados Unidos (ISLAM et al., 2009). No Brasil, o primeiro relato foi feito em frangos de corte, por Alfieri e colaboradores em 1988, a partir de então vêm sendo identificados em todo o mundo, como uma das principais etiologias virais de diarreia em diversas espécies aviárias, principalmente as comerciais (GOUGH et al., 1990; URSU et al., 2009; SILVA et al., 2011).

Os grupos A, D, F e G de RV já foram detectados em aves (Islam et al., 1999) no entanto o grupo A é o mais frequentemente encontrado, podendo também infectar o homem e diversos outros mamíferos (LINHARES et al., 2005; ALFIERI et al., 2007; MUNFORD et al., 2008).

A excreção viral em altos títulos nas fezes dos portadores e a alta resistência ambiental do vírus contribuem para a ampla disseminação das rotavirose. A transmissão ocorre principalmente pela via fecal-oral, com a ingestão de alimentos contaminados com as fezes dos animais infectados (ALFIERI et al., 2007).

Como nos mamíferos, as rotavirose em espécies aviárias são frequentemente associadas a enterites e surtos de diarreia, podendo também ocorrerem casos de infecções subclínicas (ISLAM et al., 2009; MARTELLA et al., 2009). No entanto, em aves silvestres, pouco se tem conhecimento sobre a evolução clínica da doença em questão, uma vez que os estudos envolvendo essas espécies são escassos na literatura (GOUGH et al., 1988; TAKEHARA et al., 1991; URSU et al., 2011) e com poucos esclarecimentos acerca da sua epidemiologia.

Até onde se tem conhecimento, a presente pesquisa é uma das pioneiras a utilizar a reação em cadeia mediada pela polimerase e precedida de transcrição reversa (RT-PCR) como técnica mais sensível para a detecção de rotavírus A em aves silvestres, existindo apenas um estudo reportado na literatura (URSU et al., 2011), e além de ser a primeira pesquisa que visa a detecção de rotavírus nessas espécies no Brasil, é a primeira no mundo a pesquisar especificamente a presença do grupo D nas mesmas, daí a relevância do estudo.

Além disso, o conhecimento acerca da circulação dos rotavírus é de suma importância para o desenvolvimento de adequadas medidas de controle (GUY, 1998), principalmente no que diz respeito às aves silvestres, que ainda têm o seu papel pouco elucidado na epidemiologia da doença e que constantemente vêm sendo apontadas como vetores potenciais de patógenos de importância pública e veterinária (BENSKI et al., 2009). Portanto, a aplicação continuada e alargada de técnicas moleculares que visam à identificação e caracterização de RV nessas espécies é de fundamental importância (URSU et al., 2011).

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Geral

Pesquisar a presença de rotavírus em aves silvestres mantidas em cativeiro no Estado do Pará.

1.1.2. Específicos

Investigar os grupos de rotavírus circulantes nos espécimes fecais das aves silvestres mantidas em cativeiro no Estado do Pará;

Caracterizar os eletroferotipos dos rotavírus encontrados;

Investigar especificamente a presença de rotavírus dos grupos A e D nos espécimes fecais das aves;

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Aves Silvestres

Algumas das principais ameaças à conservação da diversidade biológica são a extinção e a vulnerabilidade de espécies; fragmentação e perda de habitats; introdução de espécies exóticas e dispersão de doenças (ANDRIOLO, 2007; SILVA et al., 2010).

O conhecimento e monitorização das populações de aves que ocorrem em uma dada região são fundamentais para a investigação da sua ecologia e conservação, e consequente elaboração de estratégias integradas de proteção (HENRIQUE & PIRATELLI, 2008).

A classe das aves exibe ampla diversidade de formas e tamanhos, e as ordens, famílias, gêneros, espécies e subespécies nos quais os membros dessa classe se inserem, dependem das características morfológicas e das semelhanças e diferenças no DNA apresentados por eles. Além dos exemplares mantidos em domicílios como animais de companhia, existem diversos zoológicos e criatórios conservacionistas e comerciais de aves em diversos países (CUBAS & GODOY, 2007).

No Brasil, a grande maioria das aves e outros animais silvestres, chegam aos zoológicos e criatórios conservacionistas por meio de apreensão na natureza, retenção (doação de munícipes) ou permuta de outras instituições (SILVA & CORRÊA, 2007).

Nem sempre em cativeiro são respeitadas as leis naturais e o comportamento inerente a cada espécie aviária, o que acaba por comprometer a sobrevivência desses animais. Os criatórios devem ter ambiente limpo, temperatura, umidade e ventilação adequados e deve-se evitar a superpopulação e o estresse que podem diminuir a resistência dos animais. Os métodos de contenção devem ser conhecidos para serem adequados a cada situação, levando em consideração a espécie e o estado geral da ave manipulada (BENEZ, 2004).

As aves que são retiradas do meio em que já estão adaptadas são submetidas ao estresse de troca de criação e muitas vezes podem carrear diversos patógenos, contaminando as aves do ambiente onde foram introduzidas. Por isso, para diminuir a susceptibilidade às doenças, deve-se ter minucioso cuidado com o manejo, nutrição, limpeza e desinfecção das instalações, dentre outros fatores (BENEZ, 2004; VILLANI, 2007)

1.2.1.1. Psittaciformes

Os psitacídeos ocupam desde as áreas tropicais até as regiões frias de todo o globo terrestre. Alguns autores classificam essa ordem em duas famílias: Psittacidae (Figura 1), composta pelos papagaios, araras, periquitos, jandaias e maracanãs, e Cacatuidae, representada pelas cacatuas. Outros autores ainda incluem a Loridae como uma terceira família, representada pelos Lóris (GODOY, 2007; CUBAS & GODOY, 2007).

Das 332 espécies distribuídas entre os 78 gêneros existentes, 148 ocorrem no Novo Mundo e 184 no Velho Mundo. O Brasil, considerado o país mais rico em variedade de psitacídeos, abriga cerca de 80 espécies dessa ordem (SICK, 1997; GODOY, 2007).

Apesar de variarem bastante em seu tamanho, peso e coloração, os psitacídeos possuem características físicas marcantes que permitem o seu imediato reconhecimento. Dentre elas estão o bico forte, curto e curvo, de base larga; o maxilar móvel e a língua grossa, rica em papilas gustativas, características que os adaptaram para a quebra e ingestão de sementes e frutos (JACKSON et al., 2002; GODOY, 2007; CUBAS & GODOY, 2007).

A olfação não é tão bem desenvolvida como a visão, e possuem cabeça proporcionalmente grande e larga, com pescoço curto. As pernas são curtas e as patas, recobertas com escamas granulares, são zigodáctilas, ou seja, o primeiro e quarto dedos são voltados para trás e o segundo e terceiro para frente, o que lhes permitem destreza em seus movimentos (GODOY, 2007; CUBAS & GODOY, 2007).

A plumagem dos psitacídeos é rígida e colorida. Nos papagaios e periquitos neotropicais o verde é predominante, e, em algumas espécies, além do verde, a plumagem possui áreas em vermelho, azul e amarelo (SICK, 1997; GODOY, 2007; CUBAS & GODOY, 2007).

A maioria das espécies é monomórfica, e, nesse caso, o sexo das aves deve ser determinado através de exames de DNA ou endoscópicos. Quando existe dimorfismo sexual esse se mostra discretamente. O período reprodutivo varia em função da espécie, geralmente ocorrendo durante a primavera e o verão e o número de ovos pode ser de dois a 10, com período de incubação entre 17 a 23 dias (JACKSON et al., 2002; GODOY, 2007; CUBAS & GODOY, 2007).

A maturidade sexual varia de um a três anos entre os pequenos e grandes psitasídeos, respectivamente, (GODOY, 2007) e a longevidade em cativeiro pode chegar a 50 anos em araras e 80 anos em papagaios, segundo relatos já registrados (CUBAS & GODOY, 2007).

Os psitacídeos alimentam-se principalmente de sementes, frutos e flores. Em criadouros ou zoológicos é ideal que sejam mantidos em viveiros espaçosos que permitam o voo. Esses viveiros podem ser suspensos, evitando o contato com o solo e reduzindo a contaminação por patógenos, ou podem ser viveiros amplos com vegetação (GODOY, 2007).



Figura 1. Alguns dos principais representantes da família Psittacidae: (A) Arara macao ou araracanga (*Ara macao*), (B) Papagaio do mangue (*Amazona amazonica*).

1.2.1.2. Ciconiiformes

As aves silvestres da Ordem Ciconiiformes estão no topo da cadeia alimentar de ambientes aquáticos e em alguns casos podem tornar-se aves sinantrópicas podendo ser reservatórias e disseminadoras de doença, bem como também são vulneráveis a contaminação ambiental proveniente da atividade humana, cujos efeitos acumulativos podem diminuir a sobrevivência das espécies (FONTENELLE, 2007; SILVA et al., 2010).

No Brasil, a Ordem compreende as famílias Ardeidae, representada pelas garças e socós; Ciconiidae, representada pelo jaburu, maguari e cabeça-seca; Threskiornithidae, com o guará e colhereiro como seus principais representantes; Cochleariidae, com o arapapá como sua única espécie, e a família Cathartidae,

correspondente aos abutres das Américas (JACKSON et al., 2002; SICK, 1997; FONTENELLE, 2007).

Os representantes da família Ardeidae são, na sua maioria, aves paludícolas (SICK, 1997) e dependentes de águas rasas (HENRIQUE & PIRATELLI, 2008), ocorrendo também em águas salobras. Apresentam pernas e dedos compridos, pescoço fino e o bico longo e pontiagudo, mantendo as pernas esticadas e o pescoço encolhido no ato do voo (JACKSON et al., 2002; FONTENELLE, 2007).

A garça-branca-grande (*Casmerodius albus*) é a mais comum das espécies que habitam o território brasileiro e uma das maiores aves do país (SICK, 1997). Podem viver aos pares ou solitárias, mas geralmente são encontradas em bandos, habitando a margem de lagoas, lagos, rios, brejos, várzeas inundadas, represas, açudes, pantanais e manguezais (HENRIQUE & PIRATELLI, 2008).

Normalmente as espécies da família Ardeidae possuem hábitos diurnos e crepusculares (SICK, 1997) e não possuem dimorfismo sexual evidente, ocorrendo distinção entre a plumagem dos jovens e adultos (FONTENELLE, 2007). Podem alcançar grandes distâncias, voando em bandos ou numerosas colônias (HENRIQUE & PIRATELLI, 2008).

Alimentam-se de pequenos peixes, insetos e larvas aquáticas, crustáceos, moluscos, anfíbios e répteis, permanecendo imóveis por longos períodos em águas rasas (SICK, 1997; JACKSON et al., 2002; FONTENELLE, 2007).

A reprodução ocorre em colônias ou ninhais, compostas por outras espécies de ciconiiformes, e há uma hierarquia interespecífica na ocupação dos espaços (SICK, 1997).

As aves da família Threskiornithidae possuem as pernas mais curtas que as das demais famílias, os machos e fêmeas são semelhantes, havendo diferenças na plumagem dos jovens e dos adultos. O guará possui o bico longo e curvo e o colhereiro possui o mesmo em forma de colher (JACKSON et al., 2002; FONTENELLE, 2007).

A manutenção dos ciconiiformes em cativeiro não se torna difícil devido a facilidade de manejo e manutenção dessas aves, no entanto essas geralmente são alojadas em recintos telados com presença de tanques de água, bandejas de alimentos e bebedouros dispostos no chão. Estas características dos recintos que proporcionam um possível contato principalmente com fezes de animais sinantrópicos (roedores e aves)

que podem atuar como fontes de infecção de doenças para essas aves (FONTENELLE, 2007; SILVA & CORRÊA, 2007; SILVA et al., 2010).

A coloração rosa e vermelha da plumagem dos guarás e colhereiros depende da alimentação composta por crustáceos (SICK, 1997). Como em cativeiro é difícil a obtenção desse alimento, essas aves podem não apresentar tal coloração tão marcante, se não receberem na alimentação corantes como a cataxantina ou alimentos ricos em carotenos (FONTENELLE, 2007).

Na Figura 2 encontram-se alguns representantes das famílias Ardeidae e Threskiornithidae.



Figura 2. (A) Representantes da família Threskiornithidae: Guarás (*Eudocimus ruber*) (coloração vermelha) e Colhereiros (*Platalea ajaja*) (coloração rosa). (B) Principal representante da família Ardeidae: Garça-branca-grande (*Ardea alba*).

1.2.1.3. Falconiformes

A ordem Falconiformes é constituída por quatro famílias: Accipitridae (Figura 3), representada pelas águias e gaviões; Falconidea, pelos falcões; Sagittariidae, pela ave serpentina africana e Pandionidae, pela Águia-pescadora (SICK, 1997; PEREIRA, 2007).

A família Accipitridae é a maior e mais diversa dessa ordem. Seus membros apresentam ampla variedade morfológica e adaptativa, sendo difícil encontrar características comuns a todas as espécies. Um exemplo é a diferença de tamanho apresentada por elas, variando de pequeno a grande porte (GRANZINOLLI, 2003; PEREIRA, 2007).

Entres as principais características desses rapinantes estão as asas longas, largas, de pontas arredondadas e os olhos grandes protegidos por uma crista superciliar bem desenvolvida, conferindo-lhes uma expressão ameaçadora. Assim como na maioria dos falconiformes, as fêmeas são frequentemente maiores que os machos, fenômeno conhecido como dimorfismo sexual reverso (DSR) (JACKSON et al., 2002; PEREIRA, 2007).

Os falconiformes se adaptaram a uma variedade de habitats na América do sul, desde florestas tropicais e subtropicais, savanas e várzeas, até as cordilheiras andinas. A rotina diária de seus membros está intimamente ligada à sua anatomia, aos seus hábitos alimentares e às condições climáticas (PEREIRA, 2007).

Possuem papel ecológico no controle de populações de pequenos animais, ajudando a manter estável o equilíbrio da região onde vivem. Além disso, a ausência desses predadores pode afetar a estrutura das comunidades de presas, produzindo efeitos secundários na comunidade vegetal (AZEVEDO et al., 2003).

Os tipos de alimentos consumidos pelos membros dessa ordem são muito variados e vão desde os principais grupos de vertebrados até diferentes classes de invertebrados (GRANZINOLLI, 2003).

Dessa forma, a alimentação oferecida à esses rapinantes em cativeiro deve ser similar àquelas observadas em vida livre, com a importância da manutenção de jejuns semanais devido a alta prevalência de obesidade nessas aves, ocasionada pela falta de exercícios em cativeiro. Para evitar a obesidade, as aves devem ser alojadas em recintos alongados e com poleiros posicionados nas extremidades, permitindo que os ocupantes se exercitem (PEREIRA, 2007).



Figura 3. (A) Gavião-real (*Harpia harpyja*) e (B) Gavião-carrapateiro (*Mivalgo chimachima*), representantes da família Accipitridae

1.2.2. Rotavírus

1.2.2.1. Estrutura

Os rotavírus pertencem à família Reoviridae, gênero Rotavirus (LINHARES et al., 2005; MUNFORD et al., 2008; SANTOS & SOARES, 2008). São vírus esféricos, com aspecto de roda radiada quando observados por microscopia eletrônica, daí a origem do seu nome (latim: rota= roda) (Figura 4) (LINHARES et al., 2002; SANTOS, 2002; ALFIERI et al., 2007).

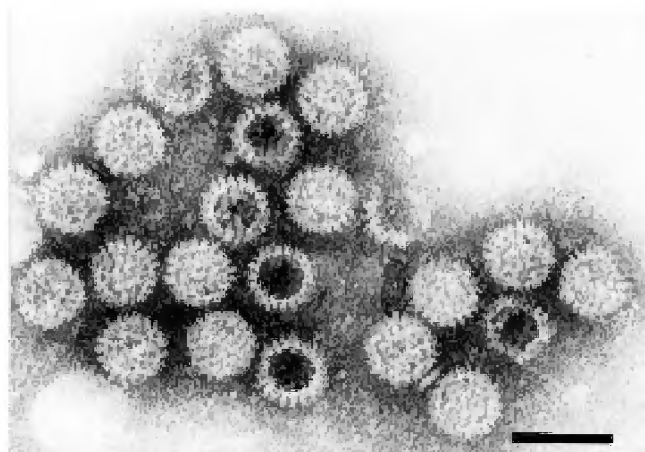


Figura 4. Eletromicrografia de partículas do RV, provenientes de um filtrado das fezes de uma criança com gastroenterite (Parashar et. al., 1998)

A partícula viral completa e infectiva apresenta aproximadamente 100 nanômetros (nm) de diâmetro (MUNFORD et al., 2008), é destituída de envelope lipoproteico e possui três camadas protéicas concêntricas de simetria icosaédrica, denominadas capsídeo externo, intermediário e interno (Figura 5) (LINHARES et al., 2005; ALFIERI et al., 2007).

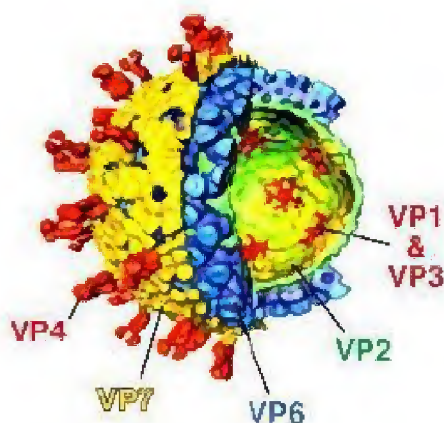


Figura 5. Demonstração da estrutura tridimensional de rotavírus, com o capsídeo externo em amarelo, o intermediário em azul e o interno (core) em verde. **Fonte:** Adaptado de Desselberger et al. (2009).

O genoma dos rotavírus, com aproximadamente 18.500 pares de base (pb), é constituído por 11 segmentos de RNA de dupla fita (dsRNA) com diferentes tamanhos moleculares, o que permite sua separação por técnicas de eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (OLIVEIRA et al., 1998; MUNFORD et al., 2008).

Cada segmento de dsRNA apresenta uma guanidina na extremidade 5' seguida por uma sequência conservada de nucleotídeos que são parte da região não codificadora dessa extremidade do genoma. Logo após, observa-se uma região aberta de leitura (ORF, Open Reading Frame) correspondente à proteína codificada pelo gene, seguida por um código terminador (stop codon). Segue-se então uma nova região não codificadora, formada por um grupo de sequências conservadas que terminam com duas citosinas na região terminal 3' (Figura 6) (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

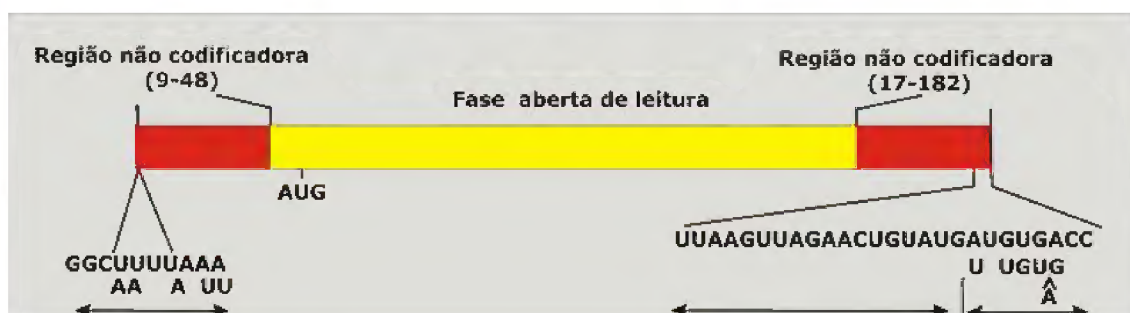


Figura 6. Estrutura do genoma dos rotavírus representado por um dos 11 segmentos de RNA. **Fonte:** Estes & Kapikian (2007).

Quase todos os mRNA terminam com a sequência consenso 5'-UGUGACC-3' que contem sinais importantes para a expressão e replicação gênica (RAMIG, 2004; ESTES & KAPIKIAN, 2007; ALFIERI et al., 2007).

Todos os genes sequenciados possuem pelo menos uma ORF longa depois do primeiro códon de iniciação. Os tamanhos das regiões não-codificadoras, nas extremidades 5' e 3', podem variar de gene para gene, mas as sequências de amostras homólogas são altamente conservadas (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Esses segmentos regulam a síntese de proteínas virais (OLIVEIRA et al., 1998), sendo seis proteínas estruturais designadas VP (viral protein), seguidas por número sequencial na ordem decrescente da massa molecular: VP1-VP4, VP6 e VP7; e seis proteínas não-estruturais denominadas NSP (non-structural protein): NSP1-NSP6 (LINHARES et al., 2000; SANTOS, 2002; RAMIG, 2004; ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008; DESSELBERGER et al., 2009), assim denominadas por persistirem apenas na morfogênese viral (OLIVEIRA et al., 1998; LINHARES et al., 2000).

Cada segmento codifica apenas uma única proteína, com exceção do segmento 11 que codifica duas proteínas não-estruturais (NSP5 e NSP6) (Figura 7) (RAMIG, 2004; LINHARES et al., 2005; ALFIERI et al., 2007).

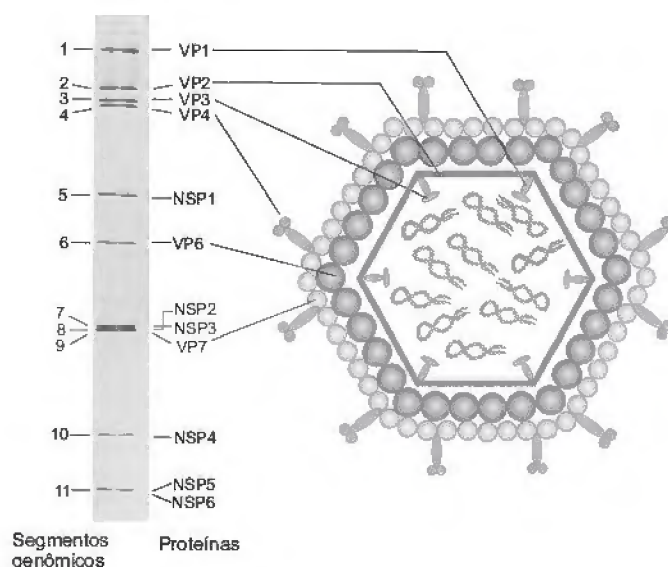


Figura 7. (Esquerda) Migração dos segmentos genômicos (dsRNA) da cepa Sa11 (Rotavírus A), pela eletroforese em gel de poliacrilamida. **(Centro)** Proteínas codificadas por cada segmento. **(Direita)** Ilustração simplificada de uma partícula vírica e os seus componentes. **Fonte:** Alfieri et al. (2007).

As proteínas VP1, VP2 e VP3 integram a camada mais interna do vírion, a qual envolve o genoma, denominada core viral (OLIVEIRA et al., 1998; LINHARES et al., 2005; MUNFORD et al., 2008; SANTOS & SOARES, 2008; DESSELBERGER et al., 2009). VP1 e VP3 ligam-se diretamente ao RNA e apresentam, respectivamente, atividade de RNA polimerase-RNA dependente e guanililtransferase (SANTOS & SOARES, 2008).

Circundando o core, encontra-se a proteína VP6, que constitui o capsídeo intermediário e representa 51% do vírion (LINHARES et al., 2005).

A VP4 e VP7 compõem o capsídeo externo e induzem, independentemente, a formação de anticorpos neutralizantes (SANTOS & SOARES, 2008), ressaltando-se, quanto à VP4, propriedades adicionais como virulência e hemaglutinação (LINHARES et al., 2005). Essa proteína é sensível à proteólise e, uma vez clivada por enzimas proteolíticas, origina dois fragmentos: VP5* e VP8*, garantindo a penetração do vírus na célula hospedeira (LINHARES et al., 2005; ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008). A VP5* está relacionada à neutralização homotípica, enquanto que a VP8* à neutralização heterotípica (LINHARES et al., 2005).

Os genes dos rotavírus, com os seus respectivos produtos e funções, estão apresentados no Quadro 1

Segmento Genômico	Proteína	Localização	Função
1	VP1	Core	RNA polimerase- RNA dependente
2	VP2	Core	Ligação ao RNA viral
3	VP3	Core	Guanililtransferase
4	VP4 (VP5* e VP8*)	Capsídeo externo	Hemaglutinina, proteína de ligação á célula, peptídeo de fusão, antígeno neutralizante
5	NSP1	Não-estrutural	Ligação ao RNA viral

6	VP6	Capsídeo interno	Antígeno de subgrupo, necessário para a transcrição
7	NSP3	Não-estrutural	Inibe a tradução de proteínas celulares, ligação ao terminal do mRNA viral
8	NSP2	Não-estrutural	Ligação ao RNA, helicase, NTPase, forma viroplasmas com NSP5
9	VP7	Capsídeo externo	Glicoproteína antígeno neutralizante
10	NSP4	Não-estrutural	Glicoproteína, papel na morfogênese, modula cálcio intracelular, enterotoxina
11	NSP5	Não-estrutural	Ligação ao RNA, forma viroplasma com NSP2, interage com VP2 e NSP6
	NSP6	Não-estrutural	Interage com NSP5, presente no viroplasma

Quadro 1. Localização e função das proteínas dos rotavírus. **Fonte:** Santos & Soares (2008)

1.2.2.2. Classificação

Os RV humanos e de animais são classificados em sorotipos/genótipos, grupos e subgrupos. Os sorotipos/genótipos são diferenciados pelas proteínas VP4 e VP7 presentes no capsídeo externo, enquanto que os grupos são determinados com base na antigenicidade da proteína VP6 do capsídeo intermediário, codificada pelo sexto segmento genômico (SANTOS & SOARES, 2008; MUNFORD et al., 2008).

São conhecidos sete grupos de RV (A-G), antigenicamente distintos (OLIVEIRA et al., 1998; PARASHAR et al., 1998; ALFIERI et al., 2007). Todos os

sete grupos infectam animais (mamíferos e aves), enquanto somente os grupos A, B e C são descritos em humanos (RAMIG, 2004; ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008; RUIZ et al., 2009).

O grupo A é o mais frequentemente encontrado, tanto em humanos, quanto em animais (LINHARES et al., 2005; ALFIERI et al., 2007; MUNFORD et al., 2008). Os demais grupos são denominados de rotavírus atípicos ou “não grupo-A”, antigamente denominados para-rotavírus (KAPIKIAN, 1993; OLIVEIRA et al., 1998; LINHARES et al., 2000; MUNFORD et al., 2008), e possuem a proteína VP6 diversa daquela comum aos RV do grupo A (KAPIKIAN, 1993; LINHARES et al., 2005).

Além de detectados no homem, os rotavírus do grupo B já foram detectados em bovinos, suínos, ovinos e roedores e os do grupo C são detectados primariamente em suínos (OLIVEIRA et al., 1998; SANTOS, 2002; ALFIERI et al., 2007). Os rotavírus do grupo E foram identificados apenas em suínos e os grupos D, F e G somente em aves (SANTOS, 2002; TROJNAR et al., 2010).

Os métodos sorológicos convencionais detectam apenas RV do grupo A, não sendo capazes de detectar os demais grupos de RV. Esses são detectados geralmente pela microscopia eletrônica, pelas técnicas de biologia molecular e pela eletroforese do RNA em gel de poliacrilamida (LINHARES et al., 2005).

Com base nesta última técnica, a identificação dos grupos de RV é feita a partir da observação do perfil de migração dos segmentos genômicos (perfil eletroforético), que são distribuídos em quatro classes de tamanho e numerados pela ordem de migração no gel (LINHARES et al., 2005; SANTOS & SOARES, 2008).

As demais classificações dos RV, subgrupos e sorotipos/genótipos, estão estabelecidas apenas para o grupo A.

Os subgrupos também são determinados pela proteína VP6 e são detectados através de ensaio imunoenzimático (EIA) utilizando-se anticorpos monoclonais (MAbs), sendo classificados em I, II, não I-não II e I+II (OLIVEIRA et al., 1998; LINHARES et al., 2005; MUNFORD et al., 2008; SANTOS & SOARES, 2008).

Os antígenos que determinam os sorotipos/genótipos estão localizados em duas proteínas do capsídeo viral externo: a VP7, antígeno dominante da superfície viral (31% da partícula), codificada pelos segmentos 7, 8 ou 9, dependendo da amostra viral, e a VP4, que por sua vez compreende 1,5% do vírion e é codificada pelo quarto segmento genômico (LINHARES et al., 2005; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Os sorotipos são determinados pela reatividade do vírus em ensaios de neutralização, usando-se soro hiperimune ou anticorpos monoclonais, enquanto que os genótipos são determinados pelo sequenciamento ou amplificação dos genes que codificam essas proteínas (SANTOS, 2002)

Dessa forma, os RV A possuem um sistema binário de classificação para os seus sorotipos/genótipos. Aqueles que têm sua classificação baseada na proteína VP7 são designados G, devido ao fato dessa proteína ser glicosilada (glicoproteína), enquanto que aqueles baseados na especificidade de VP4 são chamados de P, devido à sensibilidade dessa proteína a proteases (OLIVEIRA et al., 1998; MUNFORD et al., 2008).

A diferenciação antigênica de VP4 por sorologia é mais difícil devido a ocorrência de reações cruzadas, não havendo concordância entre a classificação em sorotipos e genótipos P, o que dificulta a unificação do sistema de classificação, ao contrário dos sorotipos e genótipos G que concordam na classificação (SANTOS et al., 2002, 2008).

Portanto, a nomenclatura estabelecida para a especificidade da VP4 das amostras de rotavírus A, é expressa por um número que corresponde ao sorotipo, após a letra P, acompanhado, em alguns casos, por uma letra maiúscula, que corresponde a um subtipo daquele sorotipo, adicionando-se então um número entre colchetes, correspondente ao seu genótipo, e a especificidade da VP7 é indicada por um número correspondente ao seu sorotipo/genótipo, logo após a letra G (LINHARES et al, 2005; MUNFORD et al., 2008; SANTOS & SOARES, 2008).

1.2.2.3. Perfil Eletroforético

Os padrões eletroforéticos dos RV são distintos e, portanto, além de serem utilizados para classificar os sete grupos existentes, também servem para diferenciar os rotavírus aviários dos RV de mamíferos (SAVITA et al., 2008).

Nos RV do grupo A de mamíferos, a migração eletroforética dos genes segue o padrão 4:2:3:2, assim distribuídos: classe I (genes 1, 2, 3 e 4), classe II (genes 5 e 6), classe III (genes 7, 8 e 9) e classe IV (genes 10 e 11) (LINHARES et al., 2005; ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008; SHUMANN et al., 2009). No entanto, nos rotavírus A de aves, a baixa mobilidade do quinto segmento genômico faz

com que esse permaneça muito próximo ou se sobreponha ao quarto segmento, apresentando o típico padrão eletroforético 5:1:3:2 (ALFIERI et al., 2000; TAMEHIRO et al., 2003; SAVITA et al., 2008; SHUMANN et al., 2009), além de que os segmentos 10 e 11, por terem massas moleculares semelhantes, co-migram e são de difícil resolução na técnica de EGPA (ALFIERI et al., 2000; TAMEHIRO et al., 2003).

Ainda com relação ao perfil eletroforético do grupo A, outra importante característica observada é a migração dos segmentos 7, 8 e 9 em forma de trinca, devido as proximidades de suas massas moleculares, não ocorrendo o mesmo nos demais grupos ditos atípicos (B-G) (ALFIERI et al., 2000, 2007).

Já os rotavírus do grupo D, segundo estudos anteriores, apresentam o padrão de migração 5:2:2:2 (KARIM et al., 2007; SAVITA et al., 2008; NITURE et al., 2010; TROJNAR et al., 2010).

Abaixo, a figura 8 demonstra a diferença entre o perfil eletroforético do grupo A de mamíferos e do grupo A e D de aves.

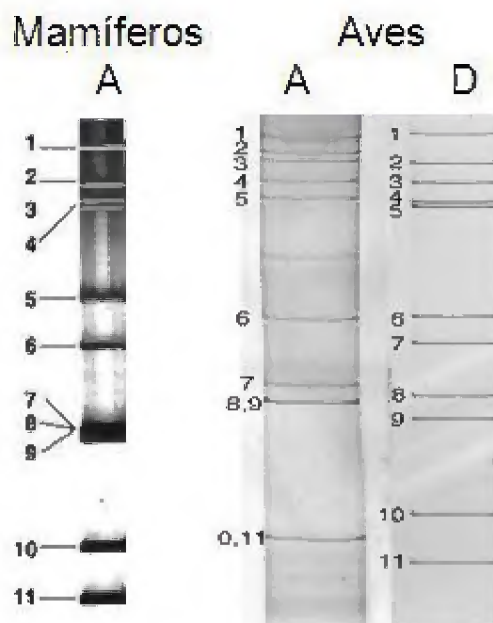


Figura 8. Demonstração do perfil eletroforético de rotavírus A de mamíferos e de rotavírus A e D de aves, através da técnica de eletroforese em gel de poliácridamida. **Fonte:** Adaptado de Desselberger et al. (2009); Johne et al., 2011.

De acordo com o perfil de migração dos dois últimos segmentos genômicos (10 e 11), o perfil eletroforético dos rotavírus A pode ser classificado em longo, curto ou

super curto (LINHARES et al., 2005; SANTOS & SOARES, 2008). No estudo conduzido por Savita et al. (2008), os rotavírus A aviários detectados apresentaram um perfil eletroforético caracterizado como curto, com o 10º e 11º segmentos genômicos migrando próximos entre si, concordando com Alfieri et al. (2000), que afirma que nos rotavírus A dessa espécie, esses segmentos co-migram na técnica de EGPA.

Quanto aos rotavírus do grupo D, estudos demonstraram que, além do perfil caracterizado como curto, o perfil longo, com migração distante entre o 10º e 11º segmentos genômicos, pode ser observado (SAVITA et al., 2008; NITURE et al., 2010).

No entanto, o perfil eletroforético não deve ser o único método utilizado para a classificação dos rotavírus, pois por se tratar de um vírus segmentado, alterações em seu genoma, como mutações, rearranjos e reagrupamentos, podem ocorrer durante infecções mistas, resultando em alterações no padrão de migração dos segmentos (ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008) e dificultando o diagnóstico, controle e profilaxia das rotaviroses (TAMEHIRO et al., 2003).

1.2.2.4. Características físico-químicas

Os RV permanecem estáveis em altas temperaturas (50 a 56°C) e em pH entre 3 e 9. Quando expostos a ação de fluorocarbono, éter e clorofórmio não perdem a infectividade e integridade. No entanto, podem ser inativados pelo uso de fenol, formalina, cloro e betapropalactona, sendo o álcool a 95% o desinfetante mais efetivo, removendo o capsídeo externo da partícula viral (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

1.2.2.5. Transmissão e sinais clínicos

A transmissão dos RV ocorre principalmente pela via fecal-oral, através de partículas virais encontradas no ambiente, na água e nos alimentos contaminados pelas fezes (ALFIERI et al., 2007).

A infecção é mais comum em aves jovens, de até um mês de idade, sendo que aquelas que se encontram entre a primeira e segunda semanas de vida apresentam os maiores índices de detecção (HAYNES, 1994; TAMEHIRO et al., 2003; AHMED & AHMED, 2006; KARIM et al., 2007; URSU et al., 2009). Após esse período, a

incidência torna-se gradualmente mais baixa (KARIM et al., 2007), no entanto, casos de rotavirose em aves entre 60-65 semanas de idade já foram relatados (NITURE et al., 2010).

O período de incubação varia de um a cinco dias (ANDREATTI FILHO, 2006, VILARREAL et al., 2006) e as partículas virais já podem ser detectadas nas fezes 24 horas após a infecção, permanecendo a disseminação do vírus pelos animais portadores por mais de 16 dias (ANDREATTI FILHO, 2006)

Como nos mamíferos, as rotavirose em espécies aviárias são frequentemente associadas a enterites e surtos de diarreia, contudo as infecções subclínicas também são comuns de ocorrerem (ISLAM et al., 2009; ANDREATTI FILHO, 2006, MARTELLA et al., 2009).

A diarreia é a principal manifestação da doença em aves clinicamente afetadas, podendo apresentar-se de leve a grave, aquosa ou amarela. Outros sinais clínicos incluem: desidratação, anorexia, fraqueza, baixo ganho de peso e aumento da mortalidade (GOUGH et al, 1988; TAMEHIRO et al., 2003, ANDREATTI FILHO, 2006; KARIM et al., 2007; MARTELLA et al., 2009; URSU et al., 2009, TROJNAR et al, 2010).

Variações na severidade dos sinais clínicos podem ser devido a diferenças na virulência de amostras de RV aviários ou interação do vírus com fatores adicionais, como infecção concomitante por outros patógenos, estresse ambiental ou resistência natural do hospedeiro (VILLARREAL et al., 2006; ISLAM et al., 2009).

1.2.2.6. Transcrição e replicação

O conhecimento acerca do processo de replicação dos RV tem sido adquirido através de estudos monitorados por microscopia eletrônica (ME) em linhagens contínuas de células renais de macaco rhesus (MA-104) (ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008).

Esses vírus apresentam tropismo por enterócitos maduros das vilosidades do intestino delgado de animais e humanos, no entanto, segundo Haynes et al. (1994), o grupo D de rotavírus tem predileção para o jejuno e íleo, enquanto o grupo A infecta preferencialmente o duodeno.

Os estágios iniciais da replicação envolvem a ligação de VP4 aos receptores celulares e a entrada na célula, onde somente as partículas com triplo capsídeo, contendo VP4 íntegra, penetram produtivamente. No entanto, alguns estudos citam a necessidade da interação da VP4 com a VP7 para otimizar esta ligação (SANTOS, 2002; ALFIERI et al., 2007).

Os receptores celulares envolvidos na entrada do rotavírus na célula ainda não foram definidos. Sabe-se que algumas amostras utilizam o ácido siálico (AS) para tal função, no entanto, a maioria dos rotavírus de origem humana e muitos de origem animal não adsorvem por esta via, supondo-se que existam pelo menos dois receptores: os ácido siálico (As) dependentes (gangliosídeos) e os As-independentes (integrinas) (SANTOS, 2002; ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008).

Após a adsorção, o vírus é internalizado em 60 a 90 minutos, com a partícula viral podendo penetrar diretamente no citoplasma através da membrana plasmática da célula, após a clivagem proteolítica de VP4 e exposição do peptídeo de fusão VP5*, ou por endocitose, sem ação das enzimas proteolíticas (SANTOS, 2002; ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008).

O processo de endocitose é cálcio-dependente e a ligação dos RV aos receptores celulares induz a formação de uma vesícula endocítica, isolando a partícula de capsídeo triplo em um compartimento celular. Por meio de difusão simples ocorre a diminuição da concentração de cálcio no interior da vesícula com perda do capsídeo externo do vírus e consequente lise vesicular. Dessa forma, as partículas subvirais, insentas de capsídeo externo, penetram no citoplasma, sendo ativas para o processo de transcrição (ALFIERI et al., 2007).

No citoplasma a proteína VP1, com sua atividade de RNA polimerase dependente de RNA, sintetiza os primeiros transcritos virais, que funcionam como mRNAs. Os mRNAs são sintetizados ordenadamente, iniciando pelos segmentos menores e, posteriormente, pelos maiores e atuam tanto como mensageiros para a tradução das proteínas virais, quanto como molde para a produção da fita negativa complementar, que permanece ligada a sua fita molde positiva formando a dupla fita de RNA, constituindo o genoma da progênie viral (SANTOS, 2002; ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008).

As proteínas virais são sintetizadas em ribossomos livres, com exceção das glicoproteínas VP7 e NSP4, que são sintetizadas nos ribossomos ligados à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER) (SANTOS, 2002).

No decorrer da síntese e acúmulo das proteínas virais (VPs e NSPs), grandes inclusões citoplasmáticas, denominadas viroplasmas, vão se formando no citoplasma das células infectadas, ocorrendo a formação das partículas subvirais com duplo capsídeo (DLPs), formadas pela VP2 e VP6 (ALFIERI et al., 2007).

Após a formação do duplo capsídeo, as partículas virais brotam para o interior do RER, através da interação com a proteína NSP4 presente na membrana desta organela. No RER ocorre a maturação final das partículas, na dependência de íons Ca^{2+} , e aquisição de um envelope lipídico transitório (SANTOS, 2002; ALFIERI et al., 2007).

O envelope lipídico é então removido por um processo coordenado pela NSP4 e o capsídeo externo (VP4 e VP7) é adicionado para formar a partícula viral madura (triplo capsídeo) que é liberada após lise celular, infectando outros enterócitos (SANTOS, 2002; ALFIERI et al., 2007; SANTOS & SOARES, 2008).

Durante a multiplicação dos vírus ocorre a morte e descamação dos enterócitos, os quais são substituídos por células das criptas intestinais que migram rapidamente em direção ao topo das vilosidades. Por serem imaturas, estas células apresentam déficit na produção de dissacarídeos e na absorção, ocasionando diarreia do tipo osmótica, com diminuição da digestão de açúcares e da absorção de sais e água, aumentando a gravidade da doença (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Infecções experimentais de aves com RV D induziram alterações morfológicas semelhantes às causadas pelos RV do grupo A, incluindo dilatação do ceco, associada com o acúmulo de gás e fluidos, encurtamento das vilosidades e hiperplasia das criptas, além de infiltração leucocitária da lâmina própria (HAYNES et al., 1994; ANDREATTI FILHO, 2006).

A figura 9 demonstra, resumidamente, o ciclo replicativo dos rotavírus nas células infectadas.

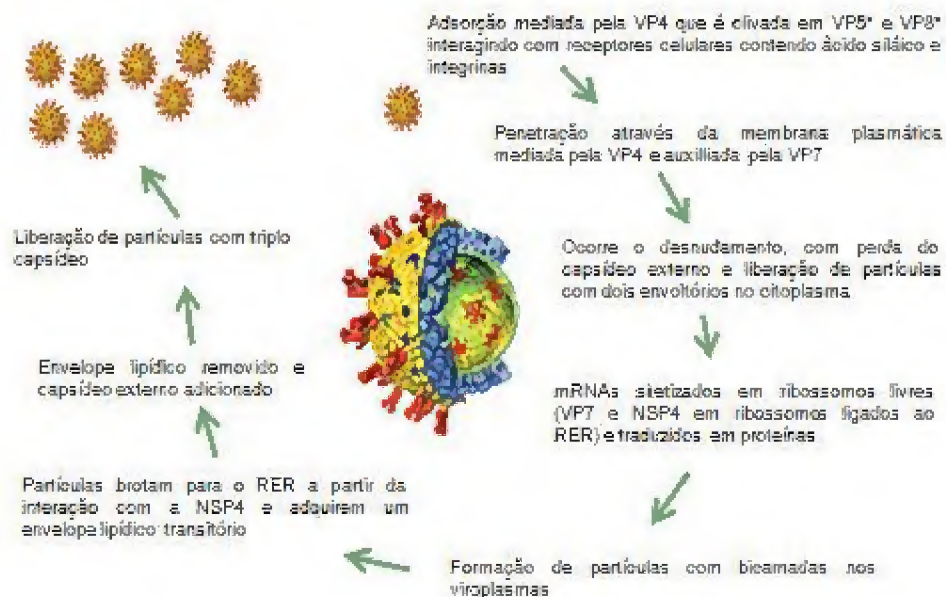


Figura 9. Esquema representativo do ciclo de replicação dos rotavírus em uma célula infectada. Após a entrada do vírus na célula, inicia-se a transcrição dos mRNAs, dos RNAs genômicos e a síntese das proteínas, que são direcionados para viroplasmatas e, posteriormente, para o retículo endoplasmático rugoso (RER), adquirindo um envelope transitório. A liberação das partículas ocorre por lise celular. **Fonte:** Adaptado de Desselberger et al., (2009).

1.2.2.7. Diagnóstico

As manifestações clínicas causadas pela infecção por rotavírus não são específicas, uma vez que diversas infecções virais também causam quadros de gastroenterites e outros sinais clínicos semelhantes, necessitando-se, portanto, de uma confirmação laboratorial. Desta forma, diversas técnicas foram desenvolvidas, tanto para detecção do vírus, quanto para a caracterização da amostra viral, realizadas diretamente a partir de amostras fecais (ESTES & KAPIKIAN, 2007).

As técnicas de biologia molecular tornaram-se imprescindíveis como ferramentas para a detecção de doenças virais, proporcionando maior rapidez e sensibilidade na detecção dos agentes (SANTOS & BENATI, 2008).

A eletroforese em gel de poliácridamida (PAGE) foi a primeira técnica utilizada para o estudo do RNA dos RV e continua sendo uma importante metodologia laboratorial e epidemiológica na caracterização das infecções causadas por esse vírus (GOUVEA et al., 1990).

É utilizada para vírus de genoma segmentado e consiste na separação dos 11 segmentos genômicos do RV em gel de poliacrilamida, podendo ser observado o perfil característico de qualquer grupo. Estes segmentos podem ser visualizados após coloração por nitrato de prata e a distância de migração de cada segmento de RNA viral na eletroforese é inversamente proporcional ao tamanho molecular do mesmo (GOUVEA et al., 1990; SANTOS & BENATI, 2008; ESTES & KAPIKIAN, 2007).

Essa técnica permite a análise de variações no genoma viral além da observação de infecção mistas (SANTOS & BENATI, 2008), no entanto possui baixa sensibilidade (OTTO et al., 2011).

Atualmente a técnica que se destaca é a reação em cadeia mediada pela polimerase e precedida de transcrição reversa (RT-PCR), de alta sensibilidade e especificidade, permitindo a detecção e caracterização dos genótipos virais, desde que se utilize primers adequados (GOUVEA et al., 1990).

Consiste, inicialmente, na síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA) utilizando como molde a fita de RNA alvo, numa reação catalisada por uma enzima denominada Transcriptase Reversa (TR). A partir de então, o cDNA recém-sintetizado passa a ser o alvo para a segunda etapa da reação de PCR, onde mais de um segmento genômico, cada um com seu iniciador específico, é amplificado numa única reação (RICHTZENHAIN & SOARES, 2007). Uma das vantagens dessa técnica é a possibilidade de detecção do ácido nucleico viral durante as fases iniciais da infecção (NITURE et al., 2010).

1.2.2.8. Epidemiologia

No Brasil não há relatos sobre a detecção ou isolamento de RV em animais silvestres, e mesmo em outros países, os dados disponíveis são escassos (EUGSTER et al., 1978; PETRIC et al., 1981; GOUGH et al., 1988; HAMIR et al., 1990; TAKEHARA et al., 1991; WANG et al., 2006; MULHERIN et al., 2008; EVEREST et al., 2009; URSU et al., 2011), estando as pesquisas mais frequentemente realizadas em seres humanos e várias espécies de animais domésticos.

Em se tratando de aves silvestres, as informações são mais raras ainda, com apenas três estudos reportados na literatura (GOUGH et al., 1988; TAKEHARA et al.,

1991; URSU et al., 2011), mas com poucos esclarecimentos sobre a epidemiologia da doença nas aves em questão.

As rotaviruses aviárias são mais frequentemente estudadas em frangos de corte (McNULTY et al., 1980; McNULTY et al., 1981; McNULTY et al., 1983; ROHWEDDER et al., 1997; TAMEHIRO et al., 2003; AHMED & AHMED, 2006; OTTO et al., 2006; VILLARREAL et al., 2006; KARIM et al., 2007; SAVITA et al., 2008; ISLAM et al., 2009; SHUMANN et al., 2009; NITURE et al., 2010; TROJNAR et al., 2010; JOHNE et al., 2011; OTTO et al., 2011), faisões (HAYNES et al., 1994; LEGROTtaglie et al., 1997; URSU et al., 2009), perus (McNULTY et al., 1980; THEIL & SAIF, 1987; OTTO et al., 2011), pombos (MINAMOTO et al., 1988; ITO et al., 1995; ITO et al., 2001); dentre outras espécies de aves em diversas partes do mundo (TAKASE et al., 1986; GOUGH et al., 1990; SILVA et al., 2011).

Embora os rotavírus dos grupos D, F e G sejam exclusivos de aves, os integrantes do grupo A, que também infectam mamíferos, são os mais dispersos nessas espécies e vêm sendo caracterizados com mais detalhes, através da análise completa ou parcial do genoma de algumas amostras aviárias (ITO et al., 2001; ROHWEDDER et al., 1997; SHUMANN et al., 2009; TROJNAR et al., 2009; URSU et al., 2009; URSU et al., 2011).

Os grupos D, F, G, são mais comumente pesquisados por técnicas menos sensíveis, como a eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) (OTTO et al., 2006; KARIM et al., 2007; SAVITA et al., 2008; ISLAM et al., 2009). Apenas recentemente os estudos com técnicas moleculares mais avançadas para detecção desses grupos vêm sendo desenvolvidos, principalmente para rotavírus D (NITURE et al., 2010; OTTO et al., 2011), e hoje já se tem uma sequência completa do genoma de uma amostra do grupo D (TROJNAR et al., 2010) e dos grupos F e G (JOHNE et al., 2011) disponíveis. No entanto, não há na literatura pesquisas direcionadas para esses grupos em aves silvestres.

No Brasil, recentemente foi realizado o primeiro estudo sobre a ocorrência de rotavírus D em aves, com análise das sequências nucleotídicas dos genes VP6 e VP7 desse grupo em frangos de corte, mas os dados ainda não foram publicados.

Ainda não se tem conhecimento sobre a existência de estudos que esclareçam a influência dos fatores climáticos e a distribuição sazonal das infecções por RV em aves. Sabe-se que em mamíferos, baixos valores de umidade relativa do ar e de índice

pluviométrico favorecem o aumento das rotaviroses, ocorrendo infecção nos períodos mais frios e secos do ano, tanto nos países tropicais quanto nos temperados. Provavelmente, esses fatores contribuem com o transporte de partículas virais a partir de poeiras formadas em superfícies contaminadas, facilitando a infecção de susceptíveis (COOK et al., 1990; ALFIERI et al., 1999; LEVY et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- AHMED, M.S., AHMED, M.U. Detection of avian rotavirus-like virus in broiler chickens in Bangladesh. **Bangl. J. Vet. Med.** 4(2), 73–77, 2006.
- ALFIERI, A.A., ALFIERI, A.F., BEUTTEMÜLLER, E.A., BRITO, B.G., MÉDICI, K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. **Semina. Ci. Agr.** 20(1), 5-11, 1999.
- ALFIERI, A.F.; TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.A. Virus entéricos RNA fita dupla, segmentado, em aves: Rotavírus, Reovírus e Picobirnavírus. **Semina.: Ci. Agrárias.** 21(1),101-113, 2000.
- ALFIERI, A.A., ALFIERI, A. F., TAKIUCHI, E., LOBATO, Z. I. P., In: FLORES, E. **Virologia Veterinária.** Santa Maria: UFSM, p. 780-793, 2007.
- ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde aviária e doenças.** São Paulo: Roca, p. 213-214, 2006.
- ANDRIOLO, A. Desafios para a conservação da fauna. In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária.** São Paulo: Roca, p. 252-287, 2007.
- AZEVEDO, M. A. G.; MACHADO, D. A.; ALBUQUERQUE, J. L. B. Aves de Rapina na Ilha de Santa Catarina, SC: composição, frequência de ocorrência, uso de habitat e conservação. **Ararajuba**, 11(1):75-81, 2003.
- BENEZ, S.M. **Aves: criação, clínica, teoria, prática: silvestres, ornamentais, avinhados.** 4ed. São Paulo: Tecmedd, 2004.
- BENSKIN, C.M., WILSON, K., JONES, K., HARTLEY, I.R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.** 84(3), 349-73, 2009.
- BERGELAND, M.E., McADARAGH, J.P., STOTZ, I. Enterite por rotavirus em perus. In: **Proceedings of the 26 th Western Poultry Diseases Conference**, Davis, CA: University of California, 1977. p. 129-120, 1977.
- BOOM, R., SOL, C.J.A., SALIMANS, M.M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P.M.E., VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. **J. Clin. Microbiol.** 28(3), 495-503, 1990.
- COOK, S.M., GLASS, R.I., LEBARON, C.W., MEI-SHANG HO. Global seasonality of rotavirus infections. **Bulletin of the World Health Organization.** 66(2), 171-177, 1990.
- CUBAS, Z.S.; GODOY, S.N. Medicina e patologia de aves de companhia. In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.J. **Atlas de Medicina, Terapêutica e Patologia de Animais Exóticos.** São Paulo: Interbook. p. 213-215, 2007.

DESSELBERGER, U.; MANKTELOW, E.; LI, W.; CHEUNG, W.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; GRAY, J. Rotaviruses and rotavirus vaccines. **Br. Med. Bull.**, v. 90, p. 37-51, 2009.

ESTES, M. K.; KAPIKIAN, A. Z. Rotaviruses. In: Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E. (E). **Virology**. 5 ed. Lippincott: Williams and Wilkins, p. 1917-1957, 2007.

EUGSTER, A.K.; STROTHERB, J.; HARTFIEL, D.A. Rotavirus (reovirus-like), infection of neonatal ruminants in a zoo nursery. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 14, 351-354, 1978.

EVEREST, D.J.; DASTJERDI, A.; GURRALA, R.; BANKS, M.; MEREDITH, A. L.; MILNE, E.M.; SAINSBURY, A.W. Rotavirus in red squirrels from Scotland. **Veterinary Record**.165(450), 2009.

FONTENELLE, J.H. Ciconiiformes. In: Cubas Z.S., SILVA J.C.R.; CATÃO-DIAS J.L. (Eds). **Tratado de Animais Selvagens: medicina veterinária**. São Paulo: Roca. p.290-300, 2007.

GODOY, S.N. Psittaciformes (Arara, Papagaio, Periquito). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. São Paulo: Roca. p. 223-251, 2007.

GODOY, S.N.; CUBAS, Z.S. Doenças virais e parasitárias em Psittaciformes- revisão. **Clínica Veterinária**, n.90, p. 32-44, 2011.

GOUGH, R.E., ALEXANDER, D.J., COLLINS, M.S., LISTER, S.A., COX, W.J. Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases in birds. **Avian Pathology**. v.17, 893-907, 1988.

GOUGH, R.E.; COLLINS, M.S.; ALEXANDER, D.J.; COX, W.J. Viruses and virus-like particles detected in samples from diseased game birds in great britain during 1988. **Avian Pathology**. v.19, 331-342, 1990.

GOUVEA, V., GLASS, R.I., WOODS, P., TANIGUCHI, K., CLARK, H.F., FORRESTER, B., FANG, Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. **J. Clin. Microbiol.** 28, 276-282, 1990.

GRANZINOLLI, M.A.M. **Ecologia alimentar do gavião-do-rabo-branco *Buteo albicaudatus* (Falconiformes: Accipitridae) no município de Juiz de Fora, sudeste do estado de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 145f, 2003.

GUY, J.S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry science**. 77(8), 1166-1175, 1998.

HAMIR, A.N.; MORIN, M.; RUPPRECHT, C. E. Rotaviral Enteritis in a Raccoon. **Journal of Wildlife Diseases**. 26(2), 262-264, 1990.

HAYNES, J.S.; REYNOLDS, D.L.; FAGERLAN, J.A.; FIX, A. S. Morphogenesis of Enteric Lesions Induced by Group D Rotavirus in Ringneck Pheasant Chicks (*Plasianus colchicus*). **Vet. Pathol.** 31:74-81, 1994.

HENRIQUE, C.A.M.; PIRATELLI, A. Etograma da garça-branca-grande, *Casmerodius albus*. **Revista Brasileira de Ornitologia.**16(3):185-192, 2008.

ISLAM, M. S., ALAM, M. M., RAHMAN, M. M., AHMED, M. U. Rotavirus infection in human and birds. **Bangl. J. Vet. Med.** 7(2), 314 – 319, 2009.

ITO, H.; MINAMOTO, N.; SASAKI, I.; GOTO, H.; SUGIYAMA, M.; KINJO, T.; SUGITA, S. Sequence analysis of cDNA for the VP6 protein of group A avian rotavirus: a comparison with group A mammalian rotaviruses. **Arch Virol** . v.140, 605-612, 1995.

ITO, H., SUGIYAMA, M., MASUBUCHI, K., MORI, Y., MINAMOTO, N. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. **Virus Research.** v.75, 123–138, 2001.

JACKSON, J.A.; BOCK, W.J; OLENDORF, D. **Grzimek's Animal Life Encyclopedia**, 2 ed. v. 8–11, Birds I – IV. Farmington Hills, MI: Gale Group, 2002.

JOHNE, R., OTTO, P., ROTH, B., LÖHREN, U., BELNAP, D., REETZ, J., TROJNAR, E. Sequence analysis of the VP6-encoding genome segment of avian group F and G rotaviruses. **Virology.** 442(2), 384–39, 2011.

KARIM, M.R., RUME, F.I., ALAM, M.M., AHMED, M.U. Molecular epidemiologic study on avian rotavirus prevailing in Bangladesh. **Bangl. J. Vet. Med.** 5 (1 & 2), 43–48, 2007.

KAPIKIAN, A.Z. Gastroenterite viral. In: WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H.; BENNETT, J.C. **Tratado de medicina interna.** 19 ed, v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1860-64, 1993.

LEGROT TAGLIE, R.; RIZZI, V.; AGRIMI, P. Isolation and identification of avian rotavirus from pheasant chicks with signs of clinical enteritis. **Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.** 20(3), 205-210, 1997.

LEVY, K., HUBBARD, A.E., EISENBERG, J.N.S. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Epidemiology.** v.38, 1487–1496, 2009.

LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P.; OLIVEIRA, C.S.; GUSMÃO, R.H.P. Gastroenterites por rotavírus. In: TONELLI, E.; FREIRE, L.M.S. **Doenças infecciosas na infância e adolescência.** 2 ed. v. 1. Rio de Janeiro: Medsi. P. 1018-40, 2000.

LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P.; OLIVEIRA, C.S.; GUSMÃO, R.H.P. Gastroenterites por rotavírus. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; MASCARENHAS, J.D.P.; OLIVEIRA, C.S.; GUSMÃO, R.H.P. Gastroenterites por rotavírus. In: FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 3 ed. São Paulo: Atheneu. p. 411-423, 2005.

McNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; MCFERRAN, J.B.; MCKILLOP, E.R.; COLLINS, D.S.; MCCRACKEN, R.M. Isolation of rotaviruses from turkeys and chickens: demonstration of distinct serotypes and RNA electropherotypes. **Avian Pathology**. v. 9, 363-375, 1980.

MARTELLA, V.; B'ANYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology** v.140, p.1-38, 2009.

McNULTY, M. S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; McFERRAN, J.B.; McCRACKEN, M. Isolation from chickens of a rotavirus lacking the rotavirus group antigen. **J. gen. Virol.** v. 55, 405-413, 1981.

McNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; MCCRACKEN, R.M. Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. **Avian Pathology**. v.12, 45-54, 1983.

MINAMOTO, N., OKI, K., TOMITA, M., KINJO, T., SUZUKI, Y. Isolation and characterization of rotavirus from feral pigeon in mammalian cell cultures. **Epidem. Inf.** v. 100, 481-492, 1988.

MULHERIN, E.; BRYAN, J.; BELTMAN, M.; O'GRADY, L.; PIDGEON, E.; GARON, L.; LLOYD, A.; BAINBRIDGE, J.; O'SHEA, H.; WHYTE, P.; FANNING, S. Molecular characterisation of a bovine-like rotavirus detected from a giraffe. **BMC Veterinary Research**. 4(46), 1-8, 2008.

MUNFORD, V., CARUSO, T.A.R., RÁCZ, M.L. Gastroenterites virais – rotavírus. In: Trabulsi, L.R., Alterthum, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu. P. 619-623, 2008.

NITURE, G.S., KARPE, A.G., PRASAD M., BHONSLE, A.V., PATIL, S.V. Detection of Group D avian rotaviruses among layer poultry from western India. **International Journal of Poultry Science**. 9 (1), 72-76, 2010.

OLIVEIRA, C.S.; GABBAY, Y.B.; ISHAK, R.; LINHARES, A.C. Gastroenterites virais. In: FARHAT, C.K.; CARVALHO, E.S.; CARVALHO, L.H.F.R.; SUCCI, R.C.M. **Infectologia pediátrica**. 2 ed. São Paulo: Atheneu. p. 394-401, 1998.

OTTO, P., LIEBLER-TENORIO, E.M., ELSCHNER, M., REETZ, J., LOHREN, U., DILLE, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (rss). **Avian. Dis.** v. 50, 411– 418, 2006.

OTTO, P.H., AHMED, M.U., HOTZEL, H., MACHNOWSKA, P., REETZ, J., ROTH, B., TROJNAR, E., JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. **Veterinary Microbiology**. v.156, 8–15, 2011.

PARASHAR, U. D.; BRESEE, J. B.; GENTSCH, J.R.; GLASSET, R. I. Rotavirus – Synopses. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.562-570, 1998.

PEREIRA, H.G., AZEREDO, R.S., LEITE, J.P., BARTH, O.M., SUTMOLLER, F., DE FARIAS, V., VIDAL, M.N. Comparison of polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE), Immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. **Mem. Int. Osw. Cruz**. v.78, 483-490, 1983.

PEREIRA, R.J.G. Falconiformes e Strigiformes (Águia, Gavião, Falcão, Abutre, Coruja). In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. São Paulo: Roca. p. 252-287, 2007.

PETRIC, M.; MIDDLETON, P.J.; RAPLEY, W.A.; MEHREN, K.G.; GRANT, C. A Survey of Zoo Mammals for Antibody to Rotavirus. **Can. J. comp. Med.** v. 45, 327-329, 1981.

RAMING, R.F. Pathogenesis of intestinal and systemic rotavirus infection . **J. Virol.**, v. 78, p. 10213-20, 2004.

RICHTZENHAIN, L.J.; SOARES, R.M. Técnicas Sorológicas e de Biologia Molecular. In: In: AGUILAR, R.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.M.; HERNÁNDEZ-DIVERS, S.J. **Atlas de Medicina, Terapêutica e Patologia de Animais Exóticos**. São Paulo: Interbook, p. 967-979, 2007.

ROHWEDDER, A., HOTOP, H., BRÜSSOW ,H. Chicken rotavirus Ch-1 shows a second type of avian VP6 gene. **Virus Genes**. 15(1), 65-71, 1997.

RUIZ, V.L.A.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F.; RODRIGUEZ, C.A.R.; SOUZA, S.L.P.; JEREZ, J.A. Isolation of rotavirus from asymptomatic dogs in Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. 61(4), 996-999, 2009.

SANTOS, N.S.O. Viroses Entéricas. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; DUTRAWIGG, M. **Introdução à virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 59-63, 2002.

SANTOS, N.S.O., SOARES, C.C. Viroses Entéricas. In: Santos, N.S.O., Romanos, M.T.V., WiGG, M.D. **Introdução á Virologia Humana**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.149-160, 2008.

SANTOS, N. S. O.; BENATI, F. J. . Diagnóstico laboratorial das viroses. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M T. V.; WIGG, M D. (Org.). **Introdução à Virologia Humana**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabra Koogan, v. 1, p. 83-116, 2008.

- SAVITA, KUSUMAKAR, A.L., MALIK, Y.P.S., MINAKSHI, PRASAD G. Detection and characterization of group a and d avian rotaviruses in india. **Indian J. Biotech.** v.7, 554-556, 2008.
- SCHUMANN, T., HOTZEL, H., OTTO, P., JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group a rotaviruses. **Virology.** v.386, 334–343, 2009.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira.** Rio de Janeiro: Nova Fronteira. p. 351-382, 1997.
- SILVA, J.C.R.S.; CORRÊA, S.H.R. Manejo sanitário e biosseguridade. In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária.** São Paulo: Roca. p. 252-287, 2007.
- SILVA, M.A.; MARVULO, M.F.V.; MOTA, R. A.; SILVA, J.C.R. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de Salmonella spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesq. Vet. Bras.** 30(7):573-580, 2010.
- SILVA, L.C., SANCHES, A.A., GREGORI, F., BRANDAO, P.E., ALFIERI, A.A., HEADLEY, S.A., JEREZ, J.A. First description of group A rotavirus from fecal samples of ostriches (*Struthio camelus*). **Research in Veterinary Science.** p.1-4, 2011.
- TAMEHIRO, C.Y., ALFIERI, A.F., MÉDICI, K.C., ALFIERI, A.A. Segmented doublestranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Braz. J. Microbiol.** 34(4), 344-348, 2003.
- TAKASE, K.; NONAKA, F.; SAKAGUCHI, M.; YAMADA, S. Cytopathic avian rotavirus isolated from duck faeces in chicken kidney cell cultures. **Avian Pathology .v.** 15, 719-730, 1986.
- TAKEHARA, K., KIUCHI, H., KUWAHARA, M., YANAGISAWA, F., MIZUKAMI, M., MATSUDA, H., YOSHIMURA, M. Identification and characterization of a plaque forming avian rotavirus isolated from a wild bird in Japan. **J Vet Med Sci.** 53(3), 479-86, 1991.
- THEIL, K. W.; SAIF, Y. M. Age-related infections with rotavirus, rotaviruslike virus, and atypical rotavirus in turkey flocks. **Journal of Clinical Microbiology.** 25(2),333-337, 1987.
- TROJNAR, E., OTTO, P., JOHNE, E. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Virology.** v.386, 325–333, 2009.
- TROJNAR, E., OTTO, P., ROTH, B., REETZ, J., JOHNE, E. The genome segments of a group D rotavirus possess group a-like conserved termini but encode group-specific proteins. **Journal of Virology.** 84(19), 10254–10265, 2010.
- URSU, K., KISFALI P.; RIGÓ, D., IVANICS, E., ERDELYI, K., ADAM, D., MELEGH, B., MARTELLA, V., BÁNYAI, K. Molecular analysis of the VP7 gene of

pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Arch Virol.** v. 154,1365–1369, 2009.

URSU, K., PAPP, H., KISFALI P., RIGÓ, D., MELEGH, B., MARTELLA, V., BÁNYAI, K. Monitoring of Group A Rotaviruses in Wild-Living Birds in Hungary. **Avian Diseases.** 55(1), 123-127, 2011.

VILLANI, R.G.D.C. Estrutura hospitalar, quarentenário e centros de triagem. In: Cubas, Z.S., Silva, J.C.R., Catão-Dias, J.L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária.** São Paulo: Roca. p. 252-287, 2007.

VILLARREAL, L.Y.B., ULIANA, G., VALENZUELA, C., CHACÓN, J.L.V., SAIDENBERG, A.B.S., SANCHES, A.A., BRANDÃO, P.E., JEREZ, J.A., FERREIRA, A.J.P. Rotavirus detection and Isolation from chickens with or without symptoms. **Brazilian Journal of Poultry Science.** 8(3), 187-191, 2006.

VRANJAC, A. Diarréia e rotavírus. **Rev. Saúde Pública,** 38(6): 844-845, 2004.

WANG, Y.; TU, X.; HUMPHREY, C.; MCCLURE, H.; JIANG, X.; QIN, C.; GLASS, R.I.; JIANG, B. Detection of viral agents in fecal specimens of monkeys with diarrhea. **J Med Primatol,** v.36, 101–107, 2006.

Pesquisa de rotavírus em aves silvestres da região amazônica mantidas em cativeiro no Estado do Pará, Brasil

Rotavirus research in Amazon wild birds kept in captivity at Pará, Brazil

*Monique Araújo Luz¹, Delana Andreza Bezerra², René Ribeiro da Silva², Andrey do Nascimento Guerreiro³, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas², Carla Cristina Guimarães de Moraes³, Nazaré Fonseca de Souza¹, Andre Marcelo Conceição Meneses¹

** Artigo formatado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Medicina Veterinária

ABSTRACT. This study aimed to investigate rotavirus in wild birds kept in captivity at Pará State, to detect and characterize the electropherotypes groups of circulating rotaviruses and investigate A and D rotavirus groups presence in fecal specimens of these birds. Fecal samples were collected at Fazenda Paricuiã (Terra Alta / PA, Brazil), in Jardim Zoobotânico da Amazônia Bosque Rodrigues Alves, Parque Ecológico Mangal das Garças, Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) and Bioparque Amazônia Crocodilo Safari in Belém/Pará/Brazil, between March 2011 and February 2012. Were collected fecal samples from 83 birds belonging to the orders: Psittaciformes (Family Psittacidae), Ciconiformes (Ardeidae and Threskiornithidae families) and Falconiformes (Family Accipitridae). Fecal suspensions were prepared from samples collected, with subsequent extraction of viral dsRNA, which was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed with specific primers for amplification of NSP4 gene of A rotavirus and VP6 gene of D rotavirus. All samples were negative by both EGPA and by RT-PCR, requiring, however, further studies aimed in wild birds kept in captivity to determine the role of these species in the rotavirus epidemiology.

Key words: rotavirus; wild birds; captivity; RT-PCR, PAGE

1 - Departamento de Medicina Veterinária, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Bairro Montese, Belém, PA CEP 66077-550, Brasil. E-mail: monique.luz@ufra.edu.br, andre.meneses@ufra.edu.br, nazavet@bol.com.br

2- Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rodovia BR 316-KM 07, S/N, Levilândia, 67030-000, Ananindeua, PA, Brasil. E-mail: joanamascarenhas@iec.pa.gov.br, delana.melo@gmail.com, renesilva@iec.pa.gov.br

3- Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará. Av. dos Universitários s/n – Jaderlandia, Castanhal, PA, Brasil, CEP: 68746-360. E-mail: andreyguerreiro23@yahoo.com.br, ccmoraes@ufpa.br

Autor para correspondência. Departamento de Medicina Veterinária, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Bairro Montese, Belém, PA, CEP 66077-550, Brasil, Tel. (91) 32105177. E-mail: monique.luz@ufra.edu.br

RESUMO. O presente estudo teve por objetivo pesquisar a presença de rotavírus em aves silvestres mantidas em cativeiro no Estado do Pará, buscando detectar os grupos e caracterizar os eletroferotipos dos rotavírus circulantes, bem como investigar especificamente a presença de rotavírus dos grupos A e D nos espécimes fecais dessas aves. Amostras fecais foram coletadas na Fazenda Paricuiã (Terra Alta/PA, Brasil), no Jardim Zoobotânico da Amazônia Bosque Rodrigues Alves, Parque Ecológico Mangal das Garças, Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e Bioparque Amazônia Crocodilo Safari em Belém/Pará, Brasil, no período compreendido entre março de 2011 e fevereiro de 2012. Foram coletadas 83 amostras fecais de aves pertencentes às ordens: Psittaciformes (família Psittacidae), Ciconiformes (famílias Ardeidae e Threskiornithidae) e Falconiformes (família Accipitridae). A partir das amostras coletadas foram preparadas suspensões fecais, com posterior extração do dsRNA viral, que foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA). A reação em cadeia mediada pela polimerase e precedida de transcrição reversa (RT-PCR) foi realizada com iniciadores específicos para a amplificação dos genes NSP4 de rotavírus A e VP6 de rotavírus D. Todas as amostras foram negativas tanto por EGPA quanto por RT-PCR, necessitando, no entanto, de mais estudos que visem à detecção dos rotavírus em aves silvestres e que contribuam com o conhecimento acerca do papel dessas espécies na epidemiologia da doença.

Palavras-chaves: rotavírus; aves silvestres; cativeiro; RT-PCR; EGPA

2.1. INTRODUÇÃO

Os rotavírus (RV) são reconhecidamente os agentes virais mais importantes associados à doença entérica em mamíferos, incluindo o homem, e em diversas espécies aviárias, principalmente as comerciais (Tamehiro et al. 2003, Ursu et al. 2009, Silva et al. 2011). São vírus esféricos da família Reoviridae, destituídos de envelope lipoproteico e cujo genoma é constituído por 11 segmentos de RNA de dupla fita (dsRNA), que codificam proteínas estruturais (VP1-VP4, VP5 e VP7) e não estruturais (NSP1-NSP6). Cada segmento codifica uma proteína, com exceção do 11º que codifica duas proteínas não estruturais (NSP5 e NSP6) (Estes & Kapikian 2007).

Os RV são classificados em sete grupos (A-G) com base na antigenicidade da proteína VP6, sendo que os grupos A, D, F e G já foram detectados em aves (Islam et al. 2009). Os poucos estudos existentes em aves silvestres não fornecem amplos esclarecimentos sobre a epidemiologia da doença, (Gough et al. 1988, Takehara et al. 1991, Ursu et al. 2011), não sendo descrito nenhum estudo realizado no Estado do Pará, bem como em todo o Brasil. Além disso, os estudos existentes nessas espécies estão relacionados apenas à detecção de RV A, não existindo pesquisas que visam à detecção específica do grupo D.

Por tanto, o objetivo do presente estudo foi pesquisar a presença de rotavírus em aves silvestres mantidas em cativeiro no Estado do Pará, buscando detectar os grupos e caracterizar os eletroferotipos dos rotavírus circulantes, bem como investigar especificamente a presença dos grupos A e D nos espécimes fecais das aves silvestres.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Coleta de amostras fecais

Amostras fecais de aves pertencentes às ordens: Psittaciformes (família Psittacidae), Ciconiformes (famílias Ardeidae e Threskiornithidae) e Falconiformes (família Accipitridae), foram coletadas da Fazenda Paricuiã, no município de Terra Alta, Mesorregião Nordeste Paraense, Brasil (latitude 01°02'28" sul e longitude 47°54'27" oeste); Jardim Zoobotânico da Amazônia Bosque Rodrigues Alves; Parque Ecológico Mangal das Garças; Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e Bioparque Amazônia Crocodilo Safari, na Mesorregião Metropolitana de Belém/Pará, Brasil (latitude 01°27'21" sul e longitude 48°30'16" oeste), no período compreendido entre março de 2011 e fevereiro de 2012.

As amostras foram colhidas diretamente dos recintos/gaiolas, forrando-se temporariamente com papel alumínio os locais abaixo dos poleiros das aves, até a obtenção das fezes. Em caso de inviabilidade dessa técnica, adotou-se o método alternativo, com a coleta sendo realizada diretamente do solo. Foram coletados “pools” ou amostras individuais de fezes. Os “pools” de espécimes fecais foram obtidos de recintos/gaiolas que tinham em média seis animais, sendo obtida uma amostra representativa dessa população. As amostras foram depositadas em tubos criogênicos estéreis, um para cada recinto/gaiola, e mantidas sob refrigeração até sua chegada ao Laboratório de Rotavírus (Seção de Virologia) do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua/PA, onde foram mantidas a -20°C até seu processamento.

2.2.2. Suspensões fecais

Foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), com clorofórmio, homogeneizadas sob agitação por 20 minutos e centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colhido e estocado a -20° C para o procedimento de extração do dsRNA viral.

2.2.3. Extração do genoma viral

O dsRNAs foram extraídos com o uso de sílica, de acordo com a técnica descrita por Boom et al. (1990), armazenados em tubo estéreis e estocados a -20°C até a realização das técnicas de detecção de rotavírus. Durante o processo, todas as medidas de controle de contaminação foram realizadas, inclusive com a utilização de controles positivo (amostra positiva para rotavírus) e negativo (água ultra pura).

2.2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

Os dsRNA extraídos foram submetidos à EGPA (Figura 12) para detecção dos grupos de rotavírus presentes e análise dos perfis eletroforéticos, de acordo com Pereira et al., (1983). Adicionou-se dez microlitros dos dsRNA extraídos, bem como dos dsRNA controles, juntamente com 2 μL do corante azul de bromofenol aos orifícios do gel de poliacrilamida a 5%, submetendo-os à eletroforese vertical a 100 Volts (V), 100 Watts (W) e 21 milli-Ampéres (mA), por 2 a 4 horas aproximadamente. Após a eletroforese as bandas virais no gel foram fixadas com etanol e ácido acético, coradas com nitrato de prata e reveladas utilizando-se hidróxido de sódio e formaldeído, com posterior visualização em negatoscópio de luz branca.

2.2.5. Reação em Cadeia da Polimerase Precedida de Transcrição Reversa (RT-PCR)

A RT-PCR foi realizada com os primers RD6F/ RD6R, específicos para a amplificação do gene VP6 do grupo D de rotavírus, e com os primers Seg 10-c-s/ Seg 10-c-as, específicos para a amplificação do gene NSP4 de rotavírus A de aves (Tabela 1). Para obtenção do DNA complementar (cDNA), primeiramente 3 μL de cada dsRNA extraído foram adicionados a 1 μL de cada par de iniciadores (20 mM Invitrogen) seguido por desnaturação durante 5 min a 95°C , aos quais foram acrescentados 16,5 μL de H_2O livre de RNase e DNase, 2,5 μL de tampão 10x (Invitrogen), 1 μL de dNTPs (10 mM, Invitrogen), 0,75 μL de MgCl_2 (50mM, Invitrogen) e 0,25 μL de RT (SuperScriptTM II, 20U, Invitrogen) totalizando um volume de 25 μL , numa reação realizada durante 1 hora a 42°C . A PCR foi então realizada num volume final de 50 μL , acrescentando-se às amostras de cDNA obtidas, 18,5 μL de H_2O livre de RNase e DNase, 2,5 μL de tampão First –stand 10x (Invitrogen), 3 μL de dNTPs (10 mM,

Invitrogen), 0,75 μL de MgCl_2 (50mM, Invitrogen) e 0,25 μL de Taq DNA polymerase (2,5 U/ μL , Invitrogen).

Para amplificação do gene VP6 de rotavírus D foram utilizadas as condições de ciclagem a seguir: 93°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 93°C durante 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 68 °C durante 7 minutos. E para a amplificação do gene NSP4 de rotavírus A, utilizou-se: 93°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, finalizando com um ciclo de 68°C durante 7 minutos.

2.2.6. Eletroforese em Gel de Agarose

Dos produtos amplificados, 10 μL foram aplicados juntamente com 2 μL de azul de bromofenol aos orifícios do gel de agarose a 1,5%, aplicando-se também 2 μL do marcador de peso molecular 123 pb. Estes foram submetidos à eletroforese horizontal durante 60 minutos a uma voltagem e amperagem médias de 120 V e 400 mA, respectivamente. Logo após, as bandas foram visualizadas em transiluminador com emissão de raios ultravioleta (UV) (GEL DOC 1000).

2.3. RESULTADOS

De março de 2011 a fevereiro de 2012, um total de 329 aves foi estudado, resultando na obtenção de 83 amostras fecais. Do total de amostras, 54 foram processadas como “pool” de espécimes fecais e 29 como espécimes individuais. Para evitar o estresse e comprometimento do bem estar animal, não houve manipulação das aves e o material fecal foi coletado diretamente do recinto/gaiola em que se encontravam, por isso, o número total de amostras coletadas não condiz com o número de aves envolvidas no estudo e sim com o número de recintos/gaiolas presentes nos locais de coleta, que abrigavam as ordens alvo do objetivo da pesquisa.

As amostras processadas como individuais foram coletadas dos recintos/gaiolas em que permanecia apenas um animal. Por sua vez, quando mais de um animal estava presente, foram coletados “pools” de fezes, o que correspondeu a uma amostra representativa daquela população. Nesse último caso, a média era de seis animais presentes por recintos/gaiolas.

Das 84 amostras coletadas, 14 eram provenientes da Fazenda Paricuiã, no município de Terra Alta, 12 do Jardim Zoobotânico da Amazônia Bosque Rodrigues Alves, 19 do Parque Ecológico Mangal das Garças, 15 do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e 23 do Bioparque Amazônia Crocodilo Safari, na Mesorregião Metropolitana de Belém/Pará. O maior número de amostras fecais obtidas foi de aves pertencentes à ordem Psittaciformes, correspondendo a 89,16% das amostras (n=74), contra apenas 7,23% (n=6) e 3,61% (n=3) das ordens Falconiformes e Ciconiformes, respectivamente. Esses dados encontram-se listados na tabela 2, discriminando-se o número de amostras individuais e pools de fezes coletados para cada ordem.

Como não houve manipulação das aves, o estado clínico das mesmas não foi observado, por tanto, não houve coleta de informações acerca da presença ou ausência de sintomatologia clínica condizente com rotavirose nos animais estudados, incluindo diarreia. Informação precisa quanto à faixa etária dos animais também não foi possível de ser obtida, no entanto sabe-se que as aves utilizadas já se encontravam na idade adulta.

Os espécimes fecais foram analisados primeiramente pela técnica de EGPA, onde todos apresentaram resultado negativo, não sendo observado nenhum perfil eletroforético condizente com algum grupo de rotavírus, exceto na amostra sabidamente positiva, utilizada como controle positivo para o teste. A partir de então, todos os espécimes foram testados por RT-PCR utilizando-se primers específicos para a amplificação dos genes NSP4 de rotavírus A e VP6 de rotavírus D. No entanto, com exceção das amostras utilizadas como controle positivo para as reações, não foi observada nenhuma amplificação desses genes, demonstrando resultado negativo em todas as amostras teste.

2.4. DISCUSSÃO

Rotavírus são identificados como um dos principais agentes etiológicos de diarreia e enterite em uma grande variedade de mamíferos e espécies aviárias (Guy 1998, Vilarreal et al. 2006). No entanto, as informações acerca da circulação desses vírus em espécies silvestres são raras em todo mundo, sendo desconhecida a existência de algum estudo reportado no Brasil.

Assim como em mamíferos, a maioria dos estirpes de RV detectados em aves, pertence ao grupo A, grupo que vem sendo constantemente estudado e elucidado com

mais detalhes nessas espécies (Ito et al. 2001, Rohwedder et al. 1997, Shumann et al. 2009, Trojnar et al. 2009, Ursu et al. 2009, Ursu et al. 2011). Somente recentemente, estudos que visam a detecção de rotavírus D vêm crescendo na literatura, porém com o uso de técnicas de baixa sensibilidade para esse fim (Otto et al. 2006, Karim et al. 2007; Savita et al. 2008, Islam et al. 2009), sendo poucos os estudos que utilizam a associação dessas técnicas com outras mais sensíveis, como no presente estudo (Niture et al. 2010, Trojnar et al. 2010, Otto et al. 2011).

Sabe-se que as aves são reservatórios de inúmeros patógenos de importância em saúde pública e veterinária e o monitoramento de aves silvestres quanto a ocorrência de vírus e outros patógenos zoonóticos vem sendo alvo de preocupações, principalmente no que diz respeito à saúde humana (Benskin et al. 2009, Ursu et al. 2011). No entanto, com relação a detecção de rotavírus, os estudos em aves silvestres ainda são escassos em todo o mundo (Gough et al. 1988, Takehara et al. 1991, Ursu et al. 2011) estando as pesquisas mais direcionadas para a detecção em aves de importância econômica e comercial, principalmente frangos de corte, perus e faisões.

Até onde se tem conhecimento, o presente estudo é o pioneiro em pesquisa de rotavírus em aves silvestres no Brasil e o primeiro no mundo a propor a detecção de rotavírus D nessas espécies com o uso de uma técnica mais sensível (RT-PCR), portanto, devido à escassez de estudos em aves silvestres, os resultados obtidos aqui serão comparados aos obtidos em outras espécies aviárias utilizadas em pesquisas anteriores.

Inicialmente buscou-se a detecção de rotavírus nos espécimes fecais das aves pela técnica de EGPA, por ser um dos métodos mais empregados, tanto em animais como em humanos, e que permite a visualização do perfil eletroforético de qualquer grupo de rotavírus (Gouvea et al. 1990, Estes & Kapikian 2007), no entanto, todas as amostras testadas no presente estudo apresentaram resultados negativos, o que pode estar relacionado com a baixa sensibilidade apresentada pela técnica (Otto et al. 2011).

No estudo conduzido por Otto et al. (2011), em frangos de corte e perus provenientes de cinco países europeus e de Bangladesh, foram encontrados 42,70% de positividade para rotavírus através da técnica de EGPA, com amostras positivas para um dos grupos, A e D, e para ambos os grupos.

No Brasil, uma alta taxa de infecção em frangos de corte foi detectada por Villarreal et al. (2006), onde 45,3% dos frangos demonstraram eletroferotipos

condizentes com rotavírus A na EGPA, no entanto, baixas taxas de infecção, com o uso dessa mesma técnica, também já foram detectadas no Brasil, por Tamehiro et al. (2003), encontrando apenas 8,5% de positividade para rotavírus, os quais não foram classificados em grupos.

Baixos índices de infecção também já foram detectados em outras partes do mundo, como nos estudos conduzidos por Karim et al. (2007), encontrando 13,81%, Ahmed & Ahmed (2006), encontrando 0,86% e Islam et al. (2009) com 13,15% de positividade para rotavírus D em frangos de corte em Bangladesh e na Índia, respectivamente. Vale ressaltar que todos esses estudos, tanto os realizados no Brasil, quanto nos outros países citados, utilizaram um número maior de amostras que o utilizado no presente estudo, o que pode ter contribuído para a detecção do vírus, ainda que em baixa percentagem.

Quanto aos estudos realizados com um menor número de amostras que o da presente pesquisa, o índice de infecção apresentado foi abaixo dos referidos acima, com 11,9% de positividade encontrado por Savita et al. (2008), sendo a maior positividade detectada para rotavírus D que para rotavírus A, e 7,84% de positividade para rotavírus D encontrados por Niture et al. (2010), ambos os estudos realizados na Índia.

A RT-PCR é uma técnica de alta sensibilidade e especificidade (Gouvea et al., 1990; Otto et al., 2011) e foi utilizada no presente estudo para confirmar os resultados obtidos pela EGPA. Para isso, todas as amostras foram testadas utilizando-se iniciadores específicos para a amplificação dos genes NSP4 de rotavírus A e VP6 de rotavírus D, no entanto, os resultados confirmaram àqueles obtidos pela técnica de EGPA e nenhuma amplificação foi observada durante a pesquisa, resultados que divergem dos encontrados por Otto et al. (2011) que através dessa técnica, encontraram positividade para rotavírus A em amostras negativas por EGPA, assim como Bezerra et al. (2012), que encontraram positividade para rotavírus D em amostras de frango negativas por EGPA, provenientes de quatro cidades do estado do Pará, Brasil. Não se tem reportado na literatura protocolos que visam à detecção do gene NSP4 de rotavírus A em aves silvestres, portanto não se tem conhecimento da sequência nucleotídica desse gene em alguma ave dessa espécie. Estudo realizado por Trojnar et al. (2009), analisando o genoma completo de uma amostra de frango, demonstrou haver estreita relação entre as sequências nucleotídicas desse gene disponíveis para amostras aviárias, levando a

acreditar que não há grandes divergências nessas sequências entre diferentes ordens e espécies de aves.

Quanto ao rotavírus D, Niture et al. (2010), em seu estudo com aves de corte, conseguiu obter amplificação do gene VP6 desse grupo em amostras sabidamente positivas por EGPA, não obtendo o mesmo resultado quando do uso de primers para a amplificação dos genes VP4 e VP7. No Estado do Pará, Brasil, Bezerra et al. (2012), também obtiveram sucesso em sua pesquisa, amplificando o gene VP6 de rotavírus D em 53% de suas amostras, esses resultados demonstram que a RT-PCR com base no gene VP6 pode ser empregada como um ensaio sensível e específico para a detecção rápida de rotavírus do grupo D em amostras fecais de aves (Niture et al. 2010).

Os rotavírus podem ser detectados em animais com ou sem manifestações clínicas, sendo que de acordo com a maioria dos estudos disponíveis na literatura, o sucesso na detecção aumenta quando são analisadas amostras com alterações em sua consistência (pastosa ou diarreica) (Tamehiro et al. 2003, Ahmed & Ahmed, 2006; Karim et al. 2007, Savita et al. 2008, Islam et al. 2009). Na presente pesquisa informações sobre a saúde das aves, incluindo a presença ou ausência de diarreia, não foram coletadas, não sendo possível estabelecer relação entre manifestações clínicas e os resultados encontrados. No entanto, casos de detecção de rotavírus em aves assintomáticas já foram relatados por Vilarreal et al. (2006), os quais afirmaram não haver diferenças significativas para detecção de rotavírus em aves com manifestações clínicas e clinicamente saudáveis.

A ausência de positividade para rotavírus no presente estudo pode ser explicada pela faixa etária das aves utilizadas. Embora não se tenha obtido informações precisas sobre a idade destas, sabe-se que a grande maioria já se encontrava em idade adulta, o que dificulta a detecção do vírus, de acordo com Tamehiro et al. (2003), Ahmed & Ahmed (2006) e Karim et al. (2007), que detectaram a presença de rotavírus em aves jovens, de até 1 mês de idade. Essa hipótese também foi levantada por Ursu et al. (2011), para explicar a baixa positividade verificada em sua pesquisa, uma vez que casos de rotavirose em aves de idade mais avançada já foram relatados (Niture et al. 2010), mas são raramente detectados.

Outro fator que pode ter contribuído para a obtenção de resultados negativos na presente pesquisa foi a baixa densidade populacional de aves por recinto/gaiolas nos cativeiros. De acordo com Alfieri et al. (1999), a alta densidade populacional contribui

para o aumento da frequência de diagnósticos de rotavírus, e no caso do presente estudo, os cativeiros abrigavam em média apenas seis aves por recinto/gaiola.

Embora a influência dos fatores climáticos e a distribuição sazonal das rotaviroses ainda não estejam completamente esclarecidas, principalmente no que diz respeito às espécies aviárias, em mamíferos estudos demonstram que os baixos valores de umidade relativa do ar e de índice pluviométrico favorecem o aumento das infecções, ocorrendo rotaviroses nos períodos mais frios e secos do ano (Cook et al. 1990, Alfieri et al. 1999, Levy et al. 2009), por tanto, o clima quente e úmido da região de estudo, juntamente com outros fatores envolvidos, pode ter dificultado a sobrevivência do vírus e contribuído para negatividade dos resultados da pesquisa. Medidas como limpeza rigorosa dos cativeiros e utilização de produtos químicos eficazes contra os rotavírus, podem também ter sido um fator importante na ausência de infecção apresentada pelas aves do presente estudo, como sugerido por Alfieri et al. (1999).

Outros fatores que podem ter sido responsáveis pelas diferenças entre os resultados encontrados no presente estudo e diversos outros realizados no mundo, utilizando iguais técnicas, são fatores inerentes à imunidade do hospedeiro (imunocompetência), à virulência da cepa, ou infecção com outros grupos de rotavírus. A hipótese das amostras fecais utilizadas na pesquisa não estarem realmente infectadas, ou apresentarem baixa carga viral, também não pode ser descartada, (Karim et al. 2007).

Os resultados negativos apresentados aqui são de suma importância para a conservação das espécies, uma vez que, as implicações epidemiológicas da dispersão de doenças interferem drasticamente nas populações de animais, tanto de cativeiro, como de vida livre (Andriolo 2007).

Os animais silvestres têm sido mantidos em cativeiro e no convívio com o ser humano desde muito tempo e, embora avanços tenham ocorrido no cuidado e manejo desses animais, observa-se a necessidade de implementação nos estudos de epizootia de doenças infecciosas e parasitárias para evitar a disseminação de várias doenças pelo mundo. Pela existência de um número muito grande de espécies nativas e exóticas, há uma carência de dados de ocorrência e manifestação desses patógenos em diferentes indivíduos silvestres (Vilani 2007).

Já foi levantada a hipótese de que os animais que têm contacto estreito com o homem, podem, eventualmente, ter um papel importante em infecções por rotavírus em seres humanos (Minamoto et al.,1988). No entanto, esse papel das aves silvestres é

desconhecido pela falta de dados das sequências nucleotídicas de rotavírus aviários que permitam a identificação destes vírus e detecção de fragmentos de seus genomas nas amostras humanas (Shumann et al. 2009).

É necessário, por tanto, a realização de mais estudos em aves silvestres, no que diz respeito a todos os grupos de rotavírus, para elucidar a real participação dessas aves na circulação desses agentes e na epidemiologia da doença, utilizando um maior número de amostras, maior espaço de tempo, animais sintomáticos e assintomáticos e de diferentes faixas etárias.

2.5. CONCLUSÃO

As aves silvestres do presente estudo não foram positivas para rotavírus, não sendo detectado nenhum grupo desse vírus nas amostras fecais das mesmas, mesmo quando investigado especificamente a presença dos grupos A e D nessas espécies.

Os resultados negativos apresentados aqui são de suma importância para a conservação dessas espécies, no entanto, é necessária a realização de mais estudos que visem a detecção de rotavírus em aves silvestres, afim de que se esclareça o papel dessas aves na epidemiologia da doença.

AGRADECIMENTOS

Stefânia Miranda, Aline Imbeloni, Antonio Messias Costa, Jorge Aarão; José Guataçara Gabriel; Amanda Paula Danin, Nivia Magalhães Freitas, Larissa dos Santos Seixas, Renata Kelly G. Bastos, Dinaiara Frago e Dennis Lima pelo apoio nas coletas das amostras, e aos integrantes do Laboratório de Rotavírus da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas, pelo apoio no processamento das amostras.

REFERÊNCIAS

- Andriolo A. Desafios para a conservação da fauna, p.252-287. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R., Catão-Dias J.L. Tratado de animais selvagens medicina veterinária. São Paulo, Roca, 2007.
- Ahmed M.S., Ahmed M.U. Detection of avian rotavirus-like virus in broiler chickens in Bangladesh. *Bangl. J. Vet. Med.*, 4(2):73-77, 2006.
- Alfieri A.A., Alfieri A.F., Beuttemüller E.A., Brito B.G., Médici K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavirose suína na região sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. *Semina. Ci. Agr.*, 20(1):5-11, 1999.

- Benskin C.M., Wilson K., Jones K., Hartley I.R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 84(3):349-73, 2009.
- Bezerra D.A., Silva R.R., Kaiano J.H.L., Silvestre R.V.D., Oliveira D.S., Linhares A.C., Gabbay Y.B., Mascarenhas, J.D.P. Detection of avian group D rotavirus using the polymerase chain reaction for the VP6 gene. *J.Virol.Methods* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.017>
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-Van Dillen P.M.E., Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 28(3):495-503, 1990.
- Cook S.M., Glass R.I., LeBaron C.W., Mei-Shang Ho. *Bulletin of the World Health Organization*. 66(2):171-177, 1990.
- Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses, p. 1917-1957. In: Knipe D. M., Howley P. M., Griffin D. E. (E). *Virology*. 5th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, 2007.
- Gough R.E., Alexander D.J., Collins M.S., Lister S.A., Cox W.J. Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases in birds. *Avian Pathology.*, 17:893-907, 1988.
- Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., Fang Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 28:276-282, 1990.
- Guy J.S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. *Poultry science.*, 77(8):1166-1175, 1998.
- Islam M.S., Alam M.M., Rahman M.M., Ahmed M.U. Rotavirus infection in human and birds. *Bangl. J. Vet. Med.*, 7(2):314-319, 2009.
- Ito H., Sugiyama M., Masubuchi K., Mori Y., Minamoto N. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. *Virus Research.*, 75:123-138, 2001.
- Karim M.R., Rume F.I., Alam M.M., Ahmed M.U. Molecular epidemiologic study on avian rotavirus prevailing in Bangladesh. *Bangl. J. Vet. Med.*, 5(1 & 2):43-48, 2007.
- Levy K., Hubbard A.E., Eisenberg J.N.S. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Epidemiology.*, 38:1487-1496, 2009.
- Minamoto N., Oki K., Tomita M., Kinjo T., Suzuki Y. Isolation and characterization of rotavirus from feral pigeon in mammalian cell cultures. *Epidem. Inf.*, 100:481-492, 1988.
- Niture G.S., Karpe A.G., Prasad M., Bhonsle A.V., Patil S.V. Detection of Group D avian rotaviruses among layer poultry from western India. *International Journal of Poultry Science.*, 9(1):72-76, 2010.
- Otto P., Liebler-Tenorio E.M., Elschner M., Reetz J., Lohren U., Dille R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (rss). *Avian. Dis.*, 50:411-418, 2006.
- Otto P.H., Ahmed M.U., Hotzel H., Machnowska P., Reetz J., Roth B., Trojnar E., Johne R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Veterinary Microbiology.*, 156:8-15, 2011.
- Pereira H.G., Azeredo R.S., Leite J.P., Barth O.M., Suttmoller F., De Farias V., Vidal M.N. Comparison of polyacrilamide Gel Electrophoresis (PAGE), Immunoelectron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid

- diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Int. Osw. Cruz.*, 78:483-490, 1983.
- Rohwedder A., Hotop H., Brüssow H. Chicken rotavirus Ch-1 shows a second type of avian VP6 gene. *Virus Genes.*, 15(1):65-71, 1997.
- Savita, Kusumakar A.L., Malik Y.P.S., Minakshi Prasad G. Detection and characterization of group a and d avian rotaviruses in india. *Indian J. Biotech.*, 7:554-556, 2008.
- Silva L.C., Sanches A.A., Gregori F., Brandao P.E., Alfieri A.A., Headley S.A., Jerez J.A. First description of group A rotavirus from fecal samples of ostriches (*Struthio camelus*). *Research in Veterinary Science*, 1-4, 2011.
- Schumann T., Hotzel H., Otto P., Johne R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group a rotaviruses. *Virology.*, 386:334-343, 2009.
- Takehara K., Kiuchi H., Kuwahara M., Yanagisawa F., Mizukami M., Matsuda H., Yoshimura M. Identification and characterization of a plaque forming avian rotavirus isolated from a wild bird in Japan. *J Vet Med Sci.*, 53(3):479-86, 1991.
- Tamehiro C.Y., Alfieri A.F., Médici K.C., Alfieri A.A. Segmented doublestranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. *Braz. J. Microbiol.*, 34(4):344-348, 2003.
- Trojnar E., Otto P., Johne E. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. *Virology.*, 386:325-333, 2009.
- Trojnar E., Otto P., Roth B., Reetz J., Johne E. The genome segments of a group D rotavirus possess group a-like conserved termini but encode group-specific proteins. *Journal of Virology.*, 84(19):10254-10265, 2010.
- Ursu K., Kisfali P., Rigó D., Ivanics E., Erdelyi K., Adam D., Melegh B., Martella V., Bányai K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Arch Virol.*, 154:1365-1369, 2009.
- Ursu K., Papp H., Kisfali P., Rigó D., Melegh B., Martella V., Bányai K. Monitoring of Group A Rotaviruses in Wild-Living Birds in Hungary. *Avian Diseases.*, 55(1):123-127, 2011.
- Villarreal L.Y.B., Uliana G., Valenzuela C., Chacón J.L.V., Saldenber A.B.S., Sanches A.A., Brandão P.E., Jerez J.A., Ferreira A.J.P. Rotavirus detection and Isolation from chickens with or without symptoms. *Brazilian Journal of Poultry Science.*, 8(3):187-191, 2006.
- Villani R.G.D.C. Estrutura hospitalar, quarentenário e centros de triagem, p.252-287. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R., Catão-Dias J.L. *Tratado de animais selvagens medicina veterinária*. São Paulo, Roca, 2007.

Tabela 1. Primers utilizados para os genes que codificam as proteínas VP6 de rotavírus D e NSP4 de rotavírus A.

Primers	Sequência 5'-3'	Gene/Gru po	Fragmento amplificado (pb)
RD6F (+)	GAGGCGCTGTCTTCAATTGCG	VP6/D	742
RD6R (-)	TGGCCAATAGTGTGTGGCAGCT		
Seg 10-c-s (+)	GGAAAGATGGAGAACGYACCA	NSP4/A	645
Seg 10-c-as (-)	GTTGGGGTACCAGGGATTAAG		

RD6F(+): RVs-D segmento 6 Forward (direto); RD6R(-): RVs-D segmento 6 Reverse (reverso) (Bezerra et al., 2012); Seg 10-c-s(+): Segmento 10-chicken-sense (senso); Seg 10-c-as (-):Segmento 10-chicken-antisense (antisense) (Trojnar et al., 2009).

Tabela 2. Total de amostras fecais coletadas de aves mantidas em cativeiro no Estado do Pará, discriminando-se o número de amostras individuais e de pools de espécimes fecais coletados de ordem e família.

Amostra	Psittaciformes	Falconiformes	Ciconiformes		Total
	Psittacidae	Accipitridae	Ardeidae		
			Threskiornithidae		
Individual	23	06	0	0	29
Pool	51	0	01	02	54
Total	74	06	01	02	83

ANEXOS

ANEXO A. Descrição detalhada das técnicas utilizadas para a detecção de rotavírus nos espécimes fecais das aves silvestres mantidas em cativeiro no Estado do Pará.

1. Suspensões fecais

- a) Para cada amostra foi identificado um microtubo cônico com capacidade de 2 mililitro (mL);
- b) Em cada tubo foi adicionado 1,0mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,4, juntamente com 160 μ L de clorofórmio
- c) Foi transferido aproximadamente 0,5g de cada amostra fecal para o tubo correspondente;
- d) Os tubos foram agitados vigorosamente por 20 minutos usando um agitador mecânico;
- e) As amostras foram centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4° C;
- d) O sobrenadante foi coletado e estocado a -20° C para a realização da extração do RNA viral.

2. Extração do genoma viral

- a) Para cada amostra foi identificado um microtubo cônico com capacidade de 1,5mL, sendo transferidos 600 microlitros (μ L) da suspensão fecal.
- b) Foram adicionados nos tubos 20 μ L de Proteinase K (20mg/mL) e 500 μ L de Tampão L6 e em seguida os tubos foram agitados em vortex.
- c) As amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C por 10 minutos, em seguida foram adicionadas 200 μ L de Etanol Absoluto (96%) e 20 μ L de sílica.
- d) Os tubos foram homogeneizados em agitador de Kline por 20 minutos a temperatura ambiente e posteriormente centrifugados a 14.000 rpm por 30 segundos.
- e) O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 μ L de Tampão L2, seguido de homogeneização em vortex e centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos.

f) O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500 μ L de Etanol 70%, seguido de homogeneização em vortex e centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos.

g) O sobrenadante foi descartado em frasco e adicionou-se 500 μ L de acetona, seguido de homogeneização em vortex e centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos.

h) O sobrenadante foi descartado e secado o sedimento em banho-maria a 56°C por 15 minutos, logo após foi adicionado 60 μ L de água livre de Dnase/RNase, seguido de homogeneização em vortex e incubação em banho-maria a 56°C por 15 minutos.

i) Após a incubação as amostras foram homogeneizadas em vortex e centrifugadas à 14.000 rpm por 4 minutos, em seguida foi coletado cuidadosamente o sobrenadante (30 a 40 μ L) e transferido para um tubo previamente identificado que foi armazenado à -20°C.

3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA)

- a) O gel de poliacrilamida foi preparado de acordo com o quadro 2 e colocado na cuba (placas de vidro e espaçadores) onde foi inserido o pente para formação dos orifícios por onde foram depositadas as amostras.
- b) O gel foi reservado à temperatura ambiente até a sua polimerização, que ocorreu em torno de 15 minutos.
- c) 10 μ l de cada dsRNA extraído foi misturado a 2 μ l de azul de bromofenol e aplicado a cada orifício do gel
- d) O gel foi submetido à eletroforese vertical a 100 Volts (V), 100 Watts (W) e 21 milli-Ampéres (mA) por aproximadamente 2 a 4 horas, utilizando-se o tampão tris glicina 10x.
- e) Após a corrida, o gel foi retirado da cuba e as bandas virais fixadas com o uso de etanol e ácido acético, coradas com nitrato de prata e reveladas utilizando-se hidróxido de sódio 10M e formaldeído a 37%
- f) O padrão eletroforético foi visualizado em negatoscópio de luz branca.

REAGENTES	CUBA PEQUENA
Água destilada	6, 280 μ L
Acrilamida/Bis-acrilamida	1, 660 μ L
Tris base	1, 870 μ L
TEMED*	11 μ L
Persulfato de amônia 10%*	133 μ L

Quadro 2. Reagentes utilizados para o preparo de gel de poliacrilamida

* Os catalisadores devem ser adicionados minutos antes de formar o gel.

4. Reação em cadeia mediada pela polimerase e precedida por transcrição reversa (RT-PCR)

A primeira etapa foi iniciada com a formação do DNA complementar (cDNA). Primeiramente, 3 μ L de cada dsRNA extraído foi acrescido a 1 μ L dos pares de iniciadores RD6F/ RD6R, Seg 10-c-s/ Seg 10-c-as e Rotvp6-f/Rotvp6-r, foi desnaturado a 97°C em termociclador por 5 minutos, seguido de choque em de gelo por 5 minutos, para a obtenção do DNA complementar (cDNA), por meio de transcrição reversa (RT) e para amplificação pela PCR. Esses iniciadores amplificarão fragmentos dos genes VP6 de rotavírus D e NSP4 e VP6 de rotavírus A, respectivamente.

As reações de Transcrição reversa (RT) foram realizadas durante 1 hora a 42°C, utilizando-se 21 μ L de uma mistura de reagentes (MIX) contendo: 16,5 μ L de H₂O livre de RNase e DNase, 2,5 μ L de tampão 10x (Invitrogen), 1 μ L de dNTPs (10 mM, Invitrogen), 0,75 μ L de MgCl₂ (50mM, Invitrogen) e 0,25 μ L de RT (20U, Invitrogen).

Os produtos de RT-PCR (cDNA) foram submetidos à amplificação pela técnica de PCR, acrescentando-se 25 μ L da mix de PCR contendo: 18,5 μ L de H₂O livre de RNase e DNase, 2,5 μ L de tampão First –stand 10x (Invitrogen), 3 μ L de dNTPs (10 mM, Invitrogen), 0,75 μ L de MgCl₂ (50mM, Invitrogen) e 0,25 μ L de Taq DNA polymerase (2,5 U/ μ L, Invitrogen).

Para amplificação do gene VP6 de rotavírus D foram utilizadas as condições de ciclagem a seguir: 93°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 93°C durante 1 minuto, hibridização dos primers a 55°C por 1 minuto, e síntese a 72°C por 1 minuto, seguidos de um ciclo final de 68 °C durante 7 minutos.

Para a amplificação do gene NSP4 de rotavírus A utilizou-se: 93°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 1 minuto, hibridização dos primers a 50°C por 1 minuto, e síntese a 72°C por 2 minutos, seguidos de um ciclo final de 68 °C durante 7 minutos.

E para a amplificação do gene VP6 de rotavírus A utilizou-se: 93°C por 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 93°C durante 1 minuto, hibridização dos primers a 55°C por 1 minuto, e sínteses a 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 68 °C durante 7 minutos.

5. Eletroforese em Gel de Agarose

A análise dos produtos da PCR (amplicons) foi realizada por eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5 % em tampão tris base, ácido bórico EDTA (0,5 M) e H₂O livre de RNase e DNase(TBE).

Após a completa dissolução do gel de agarose, foi adicionado 1µL de SYBR Safe DNA gel (Invitrogen) para cada 10 mL de agarose/TBE, aguardando-se em seguida, a completa solidificação do gel em cuba de eletroforese horizontal (SIGMA).

Dos produtos amplificados, 10 µL foram aplicados juntamente com 2 µL de azul de bromofenol aos orifícios do gel, aplicando-se também o marcador de peso molecular 123 pb diluído em TBE 1x, submetendo-os à eletroforese horizontal durante 60 minutos e à uma voltagem e amperagem médias de 120 V e 400 mA, respectivamente. Logo após, as bandas foram visualizadas em transiluminador com emissão de raios ultravioleta (UV) (GEL DOC 1000).

ANEXO B: Ilustrações dos métodos de coleta utilizados para a obtenção das amostras fecais das aves mantidas em cativeiro no Estado do Pará.

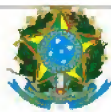


Figura 10. Demonstração das gaiolas das aves silvestres, temporariamente forradas com papel alumínio, até que se obtivessem as amostras fecais. **(A)** Coleta de “pool “ de fezes. **(B)** Coleta de amostra individual.



Figura 11. Acondicionamento de amostra fecal de aves silvestres em tubo criogênico, para posterior envio ao local de processamento.

ANEXO C: Autorização SISBIO/IBAMA para a realização da pesquisa científica



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21384-1	Data da Emissão: 01/12/2009 10:10
Dados do titular	
Nome: Andre Marcelo Conceição Meneses	CPF: 376.629.372-91
Título do Projeto: Pesquisa de rotavírus e estudo dos parâmetros hematológicos e bioquímicos em aves silvestres da região amazônica mantidas em cativeiro no Estado do Pará	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Realização das provas da PAGE	10/2009	12/2009
2	Realização das análises bioquímicas	10/2009	12/2009
3	Realização das análises hematológicas	10/2009	12/2009
4	1 colheita de material	10/2009	12/2009
5	2 colheita de material	03/2010	05/2010
6	Realização das provas da PAGE	03/2010	05/2010
7	Realização das análises bioquímicas	03/2010	05/2010
8	Realização das análises hematológicas	03/2010	05/2010
9	Realização das provas da PAGE	10/2010	12/2010
10	3 colheita de material	10/2010	12/2010
11	Realização das análises hematológicas	10/2010	12/2010
12	Realização das análises bioquímicas	10/2010	12/2010
13	Realização das provas da PAGE	03/2011	05/2011
14	4 colheita de material	03/2011	05/2011
15	Realização das análises hematológicas	03/2011	05/2011
16	Realização das análises bioquímicas	03/2011	05/2011

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as enuncias previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos, e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO atingem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Outras ressalvas

1	- A quantidade recomendada de sangue a ser coletado não deve ultrapassar 1% do peso do indivíduo, quantidade suficiente para os objetivos propostos, sendo o quantitativo autorizado para diversas pesquisas no Brasil.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
---	------	--------	-----	-----------------	---------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73595453



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21364-1	Data da Emissão: 01/12/2009 10:10
------------------------	--

Dados do titular

Nome: Andre Marcelo Conceição Meneses	CPF: 376.629.372-91
Título do Projeto: Pesquisa de rotavírus e estudo dos parâmetros hematológicas e bioquímicas em aves silvestres da região amazônica mantidas em cativeiro no Estado do Pará	
Nome da Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

1	nadia rose conceição jaimé	Aluna de graduação	452.829.192-49	-	Brasileira
2	Carla Cristina Guimarães de Moraes	Pesquisador	377.049.362-20	4020049 PC-PA	Brasileira
3	Yvone Gabby Mendes	PESQUISADOR	099.134.912-15	2105988 SEGUP-PA	Brasileira
4	Joana D'arc Pereira Mascarenhas	PESQUISADOR	128.191.902-00	1778879 SSP-PA	Brasileira
5	ALEXANDRE LUIS PADOVAN ALEIXO	Pesquisador	266.175.988-13	244201870 SSP-SP	Brasileira
6	Monique Araújo Luz	Aluna de Pós graduação	844.485.392-53	4762817 SEGUP-PA	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BELEM	PA	Criadouros regularmente cadastrados no IBAMA	Fora de UC
2	CAPITÃO POÇO	PA	Criadouros regularmente cadastrados no IBAMA	Fora de UC
3	PARAUPEBAS	PA	Criadouro regularmente cadastrados no IBAMA	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Ciconiformes, Psittaciformes, Falconiformes

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue, Fezes
---	----------------------------	---------------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZONIA	Instituição de ensino e pesquisa

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73595453



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21364-1	Data da Emissão: 01/12/2009 10:10
Dados do titular	
Nome: Andre Marcelo Conceição Meneses	CPF: 376.629.372-91
Título do Projeto: Pesquisa de rotavírus e estudo dos parâmetros hematólogicos e bioquímicos em aves silvestres da região amazônica mantidas em cativeiro no Estado do Pará	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA	CNPJ: 05.200.001/0001-01

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtd.	Tipo de amostra	Qtd.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 73595453



Página 3/3

ANEXO D. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.