



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Jéssica Cristhine Gallego

**Análise dos genes VP6 e VP7 de cepas de rotavírus identificadas em frangos
de corte com síndrome da má absorção**

Londrina
2023

Jéssica Cristhine Gallego

**Análise dos genes VP6 e VP7 de cepas de rotavírus identificadas em frangos
de corte com síndrome da má absorção**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

GALLEGO, JESSICA CRISTHINE.

Análise dos genes VP6 e VP7 de cepas de rotavírus identificadas em frangos de corte com síndrome da má absorção / JESSICA CRISTHINE GALLEGO. - Londrina, 2023.

131 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2023.

Inclui bibliografia.

1. diarreia - Tese. 2. rotavirus aviario - Tese. 3. genótipos - Tese. 4. genótipo I e G - Tese. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

Jéssica Cristhine Gallego

**Análise dos genes VP6 e VP7 de cepas de rotavírus identificadas em frangos
de corte com síndrome da má absorção**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Alaís Dall Agnol
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Michele Lunardi
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Elisabete Takiuchi
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 28 de fevereiro de 2023.

Dedico este trabalho ao querido Professor

Dr. Kledir Anderson Hofstaetter Spohr

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina, meu local de estudos, trabalho e crescimento profissional. Instituição onde conheci grandes amizades estabeleci parcerias e pela qual tenho grande carinho e orgulho de fazer parte da história. À todo o Departamento de Biociências pelo apoio, é muito bom retornar contribuindo com mais experiência.

Ao Professor Doutor Amauri Alcindo Alfieri por aceitar me orientar junto à Professora Doutora Elisabete Takiuchi e a Professora Doutora Elis Lorenzetti. Pesquisadores admiráveis que muito me ensinaram. À Professora Doutora Alice Fernandes Alfieri que junto com o Professor Amauri construíram um grande laboratório, acolhedor, bem equipado, com uma marcante contribuição científica na história da UEL e da Medicina Veterinária Preventiva e na vida de muitas pessoas.

À toda equipe do LabViral - Laboratório de Virologia Animal da Universidade Estadual de Londrina, representada pela banca de defesa, pelo acolhimento, aprendizado, conversas, suporte e cafezinhos sem açúcar.

À minha família, Letícia parceira de amor, vida e projetos, que muito admiro e me faz ter coragem de viver um paraíso em terra e em harmonia com o solo, à microvida, às plantas, aos seres vivos, ao alimento vivo com abundância e prosperidade por uma vida simples e de qualidade para nossa família multiespécie. Ao Dom Corleone, Valentim, Jimmy Nelson (*In memoriam*) felinos amados. À Chica e Marieta, puras caramelas brasileiras, nossas caninas companheiras. Aos nossos plantios, e as nossas colheitas, e ao tempo que nos seja mestre na arte/ciência da natureza.

À grande família Gallego, Cappelleso, Oliveira, Mendes e Catafesta pelas origens, pela alegria e compreensão de ser família, e por crescer de forma tão maravilhosa com a chegada da Magnólia.

Aos amigos e amigas, longes, próximos, novos ou velhos. Obrigada pelo acolhimento, aprendizado, bons momentos.

À Gelda Gonçalves e Kamyille Motta, pelo suporte terapêutico essencial na compreensão dos desafios da vida.

À ciência e à educação brasileira por me permitir enxergar com mais nitidez e lucidez.

“Do vírus menina, se faz a vacina”

Ps. - Moraes Moreira

GALLEGO, Jéssica Cristhine. **Análise dos genes VP6 e VP7 de cepas de rotavírus identificadas em frangos de corte com síndrome da má absorção**. 2023. 131 f. Tese de Doutorado em Ciência Animal - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

Rotavírus (RV) é uma das mais importantes etiologias de infecções entéricas em diferentes espécies de mamíferos e aves. RV é um vírus não envelopado, composto por 11 segmentos de RNA fita dupla que codificam seis proteínas estruturais (VP) e cinco a seis proteínas não estruturais. A VP mais abundante é a VP6 que define a espécie viral. VP4 e VP7 induzem anticorpos neutralizantes e, por isso, utilizadas para a classificação das cepas virais em genótipos P e G, respectivamente. Características antigênicas e moleculares de cepas de campo podem ser utilizadas para o conhecimento da evolução viral, rearranjos genômicos e a transmissão interespecíficas. RV identificados em aves são classificados em quatro espécies distintas, denominadas como RVA, RVD, RVF e RVG. Assim como em mamíferos, RVA também é a espécie mais descrita em aves. As espécies RVD, RVF e RVG, até o momento, foram identificadas exclusivamente em hospedeiros aviários. Estudos relacionados à caracterização molecular de cepas de RV identificados em espécies aviárias não são frequentes comparativamente às cepas provenientes de mamíferos. Este estudo teve por objetivo realizar a caracterização molecular em cepas de campo de RV aviário. Foram utilizadas 55 amostras individuais de conteúdo intestinal de frangos de corte com uma a duas semanas de idade que apresentavam quadro clínico de diarreia e síndrome da má absorção. Em estudo anterior, todas as amostras haviam sido previamente identificadas como positivas para RV por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. O objetivo do primeiro estudo foi determinar as espécies de RV aviário. Foi realizado por meio da amplificação parcial do gene VP6 com *primers* específicos para as espécies RVA, RVD, RVF e RVG. Posteriormente, foi realizado o sequenciamento dos *amplicons* com o objetivo de determinar a caracterização molecular e filogenética do gene VP6 (genótipo I) das cepas virais incluídas no estudo. Adicionalmente, no segundo estudo o objetivo foi determinar o gene VP7 (genótipo G) de 10 cepas de campo pertencentes ao RVA e de nove cepas ao RVD. Das 55 amostras positivas para RV incluídas no estudo em 10, 18 e 28 amostras foi possível à amplificação parcial do gene VP6 de RVA, RVD e RVF, respectivamente. Análises filogenéticas realizadas nos produtos do gene VP6 amplificados por RT-PCR possibilitaram classificar as 10 cepas de RVA no genótipo I11. Já as cepas de RVD e RVF apresentaram 89% e 93 a 98% de identidade de nucleotídeos (nt), respectivamente, com outras cepas disponíveis no *GenBank* descritas no Brasil e no mundo. Com relação às análises realizadas no produto da amplificação parcial do gene VP7 as cepas de RVA apresentaram 95 a 97% de identidade de nt com cepas que pertencem ao genótipo G19. A identidade de nt das nove cepas de RVD incluídas nas análises do gene VP7 apresentaram de 89 a 91% de identidade de nt com cepas de RV aviário descritas no Brasil e disponíveis no *GenBank* e 85% com a cepa protótipo 05V0049. Considerando as diversidades moleculares e antigênicas já descritas em cepas de RV, o monitoramento dos genótipos mais prevalentes em cepas de RV aviários é essencial para o desenvolvimento de ações em saúde animal e de biossegurança para a avicultura nacional.

Palavras-chave: diarreia, rotavírus aviário, genótipo, genótipo I, genótipo G

GALLEGO, Jéssica Cristhine. **VP6 and VP7 genes analysis from rotavirus strains identified at broiler chickens with runting stunting syndrome.** 2023. 131 p. Thesis (Doctorate degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

Rotavirus (RV) is one of the most important etiologies of enteric infections in different species of mammals and birds. RV is a non-enveloped virus composed of 11 segments of double-stranded RNA that encode six structural proteins (VP) and five to six nonstructural proteins. The most abundant VP is the VP6 that defines the viral species. VP4 and VP7 induce neutralizing antibodies and are therefore used to classify RV strains into P and G genotypes, respectively. Antigenic and molecular characteristics of RV field strains can be used to understand viral evolution, genomic rearrangements, and interspecies transmission. Avian RV is classified into four distinct species identified as RVA, RVD, RVF, and RVG. As in mammals, RVA is also the most described RV in avian species. The RVD, RVF, and RVG species have so far been identified exclusively in avian hosts. Studies related to the molecular characterization of RV strains identified in avian species, in comparison with RV strains from mammals, are not frequent. This study aimed to perform molecular studies on field strains of avian RV. In a previous study, all fecal samples were previously identified as RV-positive using the polyacrylamide gel electrophoresis technique. Fifty-five samples of individual intestinal contents from 1 to 2 weeks old broiler chickens with clinical signs of diarrhea and malabsorption syndrome were evaluated. The aim of the first study was to determine the presence of RV species through the partial amplification of the VP6 gene with specific primers for the avian RVA, RVD, RVF, and RVG species. Next, the sequencing analysis of the amplicons was carried out to determine the molecular and phylogenetic characterization of the VP6 gene (genotype I). Additionally, in the second study, the VP7 gene (genotype G) of 10 RV strains classified as RVA and 9 strains as RVD was partially amplified and sequenced. Of the 55 RV-positive samples in 10, 18, and 28 samples it was possible to partially amplify by RT-PCR assay the VP6 gene of RVA, RVD, and RVF, respectively. Phylogenetic analyzes performed on the VP6 amplicons enable the classification of the 10 RVA strains in genotype I11. The RVD and RVF strains showed 89% and 93 to 98% nucleotide (nt) identity, respectively, with other RV strains available on GenBank described in Brazil and worldwide. Regarding the analysis performed on the product of the partial amplification of the VP7 gene, the RVA strains showed 95 to 97% nt identity with RV strains belonging to the G19 genotype. The nt identity of the nine RVD strains included in the VP7 gene analyzes showed 89 to 91% nt identity with other RVD strains from Brazil available on GenBank and 85% with the prototype strain 05V0049. Considering the molecular and antigenic diversities already described in RV strains, the monitoring of most prevalent genotypes in avian RV strains is essential for the development of actions in animal health and biosecurity for the national poultry industry.

Keywords: runt, diarrhea, avian rotavirus, genotype, I genotype, G genotype

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1.** Eletromicrografia de partículas de rotavírus (a). Representação esquemática da estrutura do vírion e de seus componentes estruturais (b). Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando os 11 segmentos genômicos de dsRNA de uma cepa de rotavírus A (RVA) (SA11). Proteínas estruturais (VP) e não estruturais (NSP) (c). Adaptado de: Crawford *et al.* (2017) 17
- FIGURA 2.** Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando os 11 segmentos genômicos dsRNA nomeados de 1 a 11 das quatro espécies de rotavírus identificadas em aves. Canaleta 1: rotavírus G (RVG) (cepa 555), Canaleta 2: rotavírus F (RVF) (cepa A4), Canaleta 3: rotavírus D (RVD) (cepa Ch 132), e Canaleta 4: rotavírus A (RVA) (cepa Ch 1). Adaptado de: McNulty *et al.* (1984a). 26

ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

4.1 ARTIGO 1 – *Partial sequence analysis of the VP6 gene of rotavirus species A, D, and F field strains identified in diarrheic broiler chickens*

- FIGURE 1.** Phylogenetic tree based on the partial (390 bp) nucleotide (nt) sequences of the VP6 gene from the avian rotavirus species A (RVA), D (RVD), and F (RVF) described in this study and representative strains from avian RV species. The tree was constructed using the Maximum likelihood method with the Tamura 3-parameter model plus gamma distribution for nt substitution. The bootstrap values greater than 50% are shown. The GenBank accession numbers of the strains are provided. The 33 VP6 nt sequences from this study are indicated with a black square, black circle, and black inverted triangle for the avian RVA, RVD, and RVF, respectively. The VP6 gene sequence of the RVG were used as outgroup. 78

4.2 ARTIGO 2 – Determination of VP7 gene (genotype G) of avian rotavirus species A and D identified in diarrheic broiler chickens

FIGURE 1. Nucleotide maximum likelihood distance tree with Tamura 3-parameter model plus gamma and evolutionarily invariable substitution for the partial nt sequences (816 bp) of the VP7 gene obtained from avian rotavirus species A (RVA) and D (RVD) strains from the Parana state, South Brazil. The GenBank accession numbers at each node are bootstrap values greater than 50%. The 15 nucleotide RV sequences from this study are marked with a black circle and square for the avian RVA and RVD, respectively. Sequences from common G genotypes already described in avian hosts are included. The RVF (03V0568) and RVG (03V0567) strains were included as outgroup.....

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1. Produtos genômicos de rotavírus espécie A com seus respectivos valores de ponto de corte para porcentagem de identidade de nucleotídeos, genótipos e quantidade já descrita, bem como a origem da designação dos genótipos baseada na função	20
TABELA 2. Identificação de rotavírus espécie A em espécies aviárias, distribuídas de acordo com o país de origem, espécie aviária, número de amostras avaliadas, frequência de amostras positivas e técnica de detecção.	22
TABELA 3. Descrições de rotavírus espécies D, F e G em espécies aviárias no mundo (exceto Brasil), relacionadas de acordo com o país, número de amostras avaliadas e frequência de amostras positivas e técnica de detecção utilizada..	27
TABELA 4. Rotavírus espécie A em espécies aviárias no Brasil, distribuídas de acordo com o estado, número de amostras avaliadas e frequência de amostras positivas e técnica de detecção utilizada.....	31
TABELA 5. Identificação de rotavírus espécies D, F e G em espécies aviárias no Brasil, distribuídas de acordo com o local da identificação, número de amostras avaliadas e porcentagem de amostras positivas e técnica de detecção utilizada.	33
TABELA 6. Genótipos G (VP7), P (VP4) e I (VP6) de rotavírus espécie A identificados em aves distribuídos conforme o local da identificação e espécie aviária.	37
TABELA 7. Genótipos G (VP7), P (VP4) e I (VP6) de rotavírus espécie A identificados em aves no Brasil distribuídos conforme o local da identificação e espécie aviária.	39

ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

4.1 ARTIGO 1 – *Partial sequence analysis of the VP6 gene of rotavirus species A, D, and F field strains identified in diarrheic broiler chickens*

TABLE 1. Specific RT-PCR primers used for amplifying VP6 gene and

sequence of avian rotavirus field strains with information about the size of the expected amplicons, position in the genome based on the prototype strains and reference. 76

TABLE 2. Comparison of the structure of partial VP6 gene analysis of rotavirus species A strains corresponding to the 349 to 1078 nucleotides. Schematic presentation of the localization of the amino acid (aa) substitutions. The numbers above correspond to the aa position compared with reference strain 06V0661 (GenBank accession number: EU486969). The sequences obtained in this study are marked in bold plus ■ symbol. 77

TABLE 3. Comparison of the structure of partial VP6 gene sequence analysis of rotavirus species F strains corresponding to the 90 to 870 nucleotides. Schematic presentation of the localization of the amino acid (aa) substitutions. The numbers above correspond to the aa position compared with reference strain 03V0568 (GenBank accession number: NC021635). The sequences obtained in this study are marked in bold plus ▼ symbol. 80

TABLE 4. Comparison of the structure of partial VP6 gene sequence analysis of rotavirus species F strains corresponding to the 90 to 870 nucleotides. Schematic presentation of the localization of the amino acid (aa) substitutions. The numbers above correspond to the aa position compared with reference strain 03V0568 (NC021635). The sequences obtained in this study are marked in bold plus ▼ symbol. 81

4.2 ARTIGO 2 – Determination of VP7 gene (genotype G) of avian rotavirus species A and D identified in diarrheic broiler chickens

TABLE 1. Divergence of deduced amino acid (aa) sequences between rotavirus species A (RVA) strains from this study marked in bold and the prototype RVA 04V0027G6. The numbers above the sequences indicate the position of the aa in the VP7 protein, dots indicates a similar aa sequence to the prototype RVA strain. 95

TABLE 2. Divergence of deduced amino acid (aa) sequences between RVD strains from this study marked in bold and the prototype RVD 05V0049. The numbers above the sequences indicate the position of the aa in the VP7 protein, dots indicate a similar aa to the prototype RVD strain. 96

TABLE 3. Distribution of rotavirus species A by the 14 G genotypes detected across various avian species. Each black circle indicates a study that the G genotype was reported worldwide

and each black square indicates a study from Brazil that reported the G genotype. The reported G genotype from this study was marked with white triangle. 97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	<i>amino acids</i> (aminoácidos)
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
C. celular	Cultivo celular e isolamento
Clon	Clonagem
dsRNA	<i>double stranded Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico de fita dupla)
EGPA	Eletroforese em gel de poliacrilamida
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Ensaio imunoenzimático)
HA	Hemaglutinação
HI	Inibição da hemaglutinação
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus)
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
NCDV	<i>Nebraska calf diarrhea virus</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (sequenciamento de próxima geração)
NR	Não relatado
NSP	<i>Non-structural protein</i> (proteína não estrutural)
ME	Microscopia eletrônica
ORF	<i>Open reading frame</i> (sequência aberta de leitura)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RCWG	<i>Rotavirus Classification Working Group</i>
RFPL	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i> (Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase)

RT-PCR- FLAC	RT-PCR <i>method full-length amplification of cDNA</i> (Método de amplificação completa do cDNA)
RT-qPCR	RT-PCR quantitativa
RV	Rotavírus
RVA	<i>Rotavirus species A</i> (Rotavírus espécie A)
RVD	<i>Rotavirus species D</i> (Rotavírus espécie D)
RVF	<i>Rotavirus species F</i> (Rotavírus espécie F)
RVG	<i>Rotavirus species G</i> (Rotavírus espécie G)
SMA	Síndrome da Má Absorção
SN	Soroneutralização
SEQ	Sequenciamento
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VP	<i>Viral protein</i> (proteína viral)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Estrutura e Classificação de Rotavírus	16
2.2 Rotavírus Aviário	21
2.2.1 Rotavírus aviário espécie A.....	36
2.2.2 Rotavírus aviário espécies D, F e G.....	41
2.3 Coinfecções	42
2.4 Referências.....	44
3 OBJETIVOS	61
3.1 Objetivo Geral	61
3.2 Objetivos Específicos	61
4 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	62
4.1 Partial sequence analysis of the VP6 gene of rotavirus species A, D, and F in field strains identified in diarrheic broiler chickens	62
4.2 Determination of VP7 gene (genotype G) of avian rotavirus species A and D identified in diarrheic broiler chickens	82
5 CONCLUSÕES	99
6 PERSPECTIVAS	100
APÊNDICE	101
APÊNDICE A - Informe Técnico	102
ANEXOS	108
ANEXO A - Lista de Reagentes.....	109
ANEXO B - Soluções e Tampões	111
ANEXO C - Sequências de <i>Primers</i>	113
ANEXO D - Diluição de <i>Primers</i>	114
ANEXO E - Protocolo de Técnicas	116
ANEXO F - <i>Pipeline</i> do Processamento das Amostras	128
ANEXO G - Tamanho e posição dos fragmentos amplificados	130
ANEXO H - Lista de <i>Softwares</i>	131

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o último relatório anual da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2021, o Brasil produziu 14,3 milhões de toneladas de carne de frango. A indústria avícola brasileira exporta 32,2% de sua produção para 151 países. O restante (67,8%) da produção é destinado ao mercado interno onde o consumo per capita é de 45,66 kg/habitante. O estado do Paraná se mantém há mais de 10 anos como maior produtor e exportador da carne de frango e, em 2021, foi responsável por 35,5% da produção e por 40,48% da exportação nacional. Os dois maiores importadores da carne de frango do Brasil são os mercados consumidores da Ásia e Oriente Médio que absorvem 66,5% da produção (ABPA, 2022).

A proteína animal proveniente da produção comercial de frangos é uma das mais rentáveis quando comparada a outras produções animais terrestres. Na criação de frangos, a eficiência para ganho de proteína é de 33% sendo necessários 2,51 kg de proteína vegetal para produzir 1 kg de proteína de frango (Wu *et al.*, 2014). Adicionalmente, a avicultura comercial de corte possui a menor pegada hídrica na produção de proteína animal, com 4,32 litros para cada kg de carne de frango produzido (Mekonnen; Hoekstra, 2012). A esse consumo deve-se adicionar cerca de 10,43 ($\pm 2,39$) litros de água por quilo de carne processada (abate ao processamento) (Kiepper *et al.*, 2008).

O desenvolvimento da produção avícola industrial se sustenta em três pilares representados pela genética, nutrição e sanidade. As pesquisas e melhorias promovidas nesses pilares resultam em melhores taxas de crescimento das aves de produção e, conseqüentemente, de produtividade (ABPA, 2022). Tais pilares se desenvolveram visando a saúde do principal sistema envolvido na produção de proteína animal, o sistema gastrointestinal, que atua na digestão e absorção dos nutrientes (Ravindran; Abdollahi, 2022).

O manejo sanitário tem uma relação intrínseca com a saúde gastrointestinal, uma vez que a colonização do sistema digestório das aves ocorre principalmente a partir do ambiente circundante e de indivíduos próximos (Newell; Fearnley, 2003). Compreendendo o processo de infecção dos patógenos entéricos, a via fecal-oral, por meio de fômites como comedouros e bebedouros pode constituir-se em importante via de transmissão desses patógenos entéricos durante o curto período

de vida produtiva das aves (Newel; Fearnley, 2003). Entre os lotes produtivos, a cama de aviário pode ser uma das principais formas de manutenção dos patógenos entéricos no ambiente produtivo. Considerando ainda as características do hospedeiro, o comportamento dos frangos de forragear ciscando o chão (Wood-Gush, 1955) completam o ciclo fecal-oral.

Somadas aos aspectos do ambiente produtivo e do hospedeiro, características do agente viral garantem maior resistência da partícula viral íntegra e, portanto, infecciosa. Rotavírus (RV) é o principal agente etiológico viral de infecção entérica associado à diarreia nas primeiras semanas de vida de animais de produção. O vírion, desprovido de envelope, é composto por um capsídeo com três camadas concêntricas de proteínas (Crawford *et al.*, 2017). Em aves, quatro espécies RVA, RVD, RVF e RVG podem cocircular e coinfetarem indivíduos em um mesmo ambiente produtivo (Beserra; Gregori, 2014; Otto *et al.*, 2012; Pauly *et al.*, 2017), favorecendo a ocorrência de recombinações gênicas (Desselberger, 2014).

Existe grande variabilidade molecular e, conseqüentemente, antigênica, dos genes que codificam as proteínas estruturais e não estruturais de cepas de RV identificadas em mamíferos e espécies aviárias. Até o momento para a espécie RVA, apenas com relação a duas proteínas estruturais do vírion, VP6 e VP7, já foram descritos 32 genótipos I e 42 genótipos G, respectivamente, de acordo com o *Rotavirus Classification Working Group - RCWG* (2021). Em espécies aviárias, até o momento, foram descritos três genótipos I (I4, I11 e I21) e 14 genótipos G (G1, G3, G5, G6, G7, G8, G10, G11, G17, G18, G19, G22, G23 e G28) (Fujii *et al.*, 2022a; Fujii *et al.*, 2022b; Patzina-Mehling *et al.*, 2020; Schumann *et al.*, 2009; Ursu *et al.*, 2009). A classificação em genótipos atualmente não abrange as espécies de RV não-A.

O monitoramento das espécies e, principalmente, dos genótipos das cepas de RV circulantes em humanos, em animais de produção e silvestres tem grande importância para o entendimento da epidemiologia das infecções, bem como para o desenvolvimento e avaliação de medidas de controle e profilaxia (Pinheiro *et al.*, 2022). Considerando que em RV, além da diversidade antigênica, existe a probabilidade de infecção interespecie e, principalmente, de infecções zoonóticas, o constante monitoramento, tanto das espécies virais quanto dos genótipos circulantes nas populações, é uma importante ferramenta epidemiológica (Falkenhagen *et al.*, 2019).

2 REVISÃO DE LITERATURA

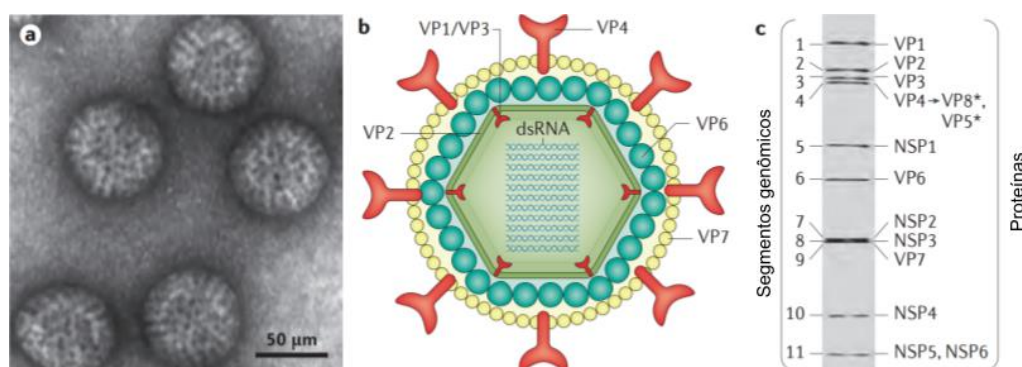
A rotavirose, infecção entérica ocasionada por RV, é a principal causa viral de diarreia em crianças e animais em todo o mundo (Caddy *et al.*, 2021). Com relação aos animais, RV já foi identificado em várias espécies de animais de produção e silvestres (Desselberger, 2014). Em medicina veterinária uma característica importante da rotavirose é a maior suscetibilidade à infecção, que compreende o período do nascimento até a segunda e terceira semana de idade. Os animais de produção tanto mamíferos, com destaque para leitões e bezerros, quanto as aves são suscetíveis (Estes; Kapikian, 2007).

RV já foi identificado em uma série de espécies de aves domésticas e silvestres (Day; Zsack, 2013; Duarte *et al.*, 2020). A infecção em aves de produção pode ocasionar prejuízos econômicos à avicultura de corte e de postura por interferir negativamente nos parâmetros produtivos dos lotes clinicamente comprometidos (Gallego *et al.*, 2022). A rotavirose é a infecção viral entérica mais frequente em pintainhos nas duas primeiras semanas de idade, resultando em sinais clínicos como diarreia e desidratação. As aves acometidas por RV geralmente são mais suscetíveis às infecções secundárias, com destaque para *Escherichia coli*, *Eimeria* sp. e *Salmonella* sp. (Dhama *et al.*, 2015). A consequência direta desses desafios sanitários é o aumento dos custos de produção.

2.1 ESTRUTURA E CLASSIFICAÇÃO DE ROTAVÍRUS

RV pertence ao reino *Riboviria*, filo *Duplornaviricota*, ordem *Reovirales*, família *Sedoreoviridae*, gênero *Rotavirus* (ICTV, 2021). O vírion não envelopado, apresenta 70 a 100 nm de diâmetro com capsídeo formado por três camadas proteicas concêntricas distintas que estruturam a partícula viral com morfologia esférica e simetria icosaédrica circundando o genoma viral (Figura 1a) tal morfologia na microscopia eletrônica que dá origem ao nome *Rota* do latim, que traduzido significa roda (Caddy *et al.*, 2021). Essa estrutura do vírion confere maior estabilidade e resistência da partícula viral no ambiente (Figura 1b) (Estes; Kapikian, 2007).

Figura 1. Eletromicrografia de partículas de rotavírus (a). Representação esquemática da estrutura do vírion e de seus componentes estruturais (b). Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando os 11 segmentos genômicos de *dsRNA* de uma cepa de rotavírus A (RVA) (SA11). Proteínas estruturais (VP) e não estruturais (NSP) (c).



Adaptado de: Crawford *et al.* (2017).

O genoma de RV é formado por 11 segmentos de RNA fita dupla (*dsRNA*) (Figura 1c) (Estes; Kapikian, 2007). Os segmentos de diferentes tamanhos moleculares, quando somados, tem aproximadamente 18.550 pares de bases (18.5 kb) (Desselberger, 2014). O genoma *dsRNA* segmentado aumenta a possibilidade de mutações pontuais, recombinações e rearranjo de segmentos genômicos por ressortimento genético (Malik *et al.*, 2020). Cada segmento de *dsRNA* é dividido em três regiões, sendo uma região 5' não codificadora com uma extremidade guanidina, seguida por uma sequência aberta de leitura (ORF - *open reading frame*) e uma região 3' não codificadora com uma extremidade citosina (Estes; Kapikian, 2007).

Cada segmento genômico codifica uma proteína, exceto o segmento 11, que em algumas espécies de RV pode codificar duas proteínas não estruturais (Estes; Kapikian, 2007). Seis proteínas são estruturais (VP – *viral protein*) nomeadas de VP1 a VP4 e VP6 a VP7, e cinco ou seis proteínas são não estruturais (NSP – *non structural protein*) nomeadas de NSP1 a NSP5/6 (Estes; Kapikian, 2007). Na partícula viral infecciosa as VPs determinam a especificidade de hospedeiro, as funções enzimáticas e possibilitam a entrada do vírus na célula hospedeira (Caddy *et al.*, 2021). Seis proteínas compõem a estrutura da partícula viral (Estes; Kapikian, 2007). Na camada interna da partícula viral estão as proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 formando o *core* viral (Crawford *et al.*, 2017). A proteína VP1 é uma RNA polimerase dependente

de RNA com atividade de replicação e transcrição, é considerada a maior VP do vírus, com 1.080 a 1.160 aminoácidos (aa), é codificada pelo primeiro segmento genômico. A proteína VP2 (895 a 914 aa) é codificada pelo segundo segmento genômico, enquanto as proteínas VP1 e VP3 se ligam à estrutura formada pela VP2, que em maior número, circundam o genoma viral. A proteína VP3 (728 a 839 aa), codificada pelo terceiro segmento genômico, é responsável por adicionar a estrutura CAP na extremidade 5' (Estes; Kapikian, 2007).

Circundando o *core* viral, a VP6 (391 a 399 aa) forma a camada intermediária da partícula viral (Crawford *et al.*, 2017). É a VP mais abundante, além de possuir importantes sítios antigênicos. Com base nas propriedades imunogênicas e antigênicas da proteína VP6 e nas sequências nucleotídicas do gene que a codifica, as cepas de RV podem ser classificadas em nove espécies distintas denominadas RVA, RVB, RVC, RVD, RVF, RVG, RVH, RVI e RVJ (ICTV, 2021; Matthijnssens *et al.*, 2012). Recentemente, duas novas espécies RVK e RVL, identificadas em pequenos mamíferos silvestres, os musaranhos, foram propostas (Johne *et al.*, 2019; Johnne *et al.*, 2022). As espécies A, B, C e H ocasionam infecção em humanos e animais, e as espécies D, F, G, I e J foram descritas somente em animais (Bányai *et al.*, 2017; Matthijnssens *et al.*, 2012; Mihalov-Kovács *et al.*, 2015). Até o momento, somente quatro espécies de RV (A, D, F e G) foram detectadas em amostras biológicas provenientes de aves (Bergeland *et al.*, 1977; Mascarenhas *et al.*, 2016; McNulty *et al.*, 1984; Otto *et al.*, 2006; Schumann *et al.*, 2009).

Por fim, na camada externa do capsídeo de RV, estão as proteínas de interação inicial com a célula do hospedeiro (Desselberger, 2014). A proteína VP4 ou proteína protease (P) sensível, formada por 686 a 770 aa, é codificada pelo quarto segmento genômico e possui duas ORFs (VP8* e VP5*). A glicoproteína VP7 (247 a 329 aa) é codificada pelo nono segmento genômico (Buragohain, 2008; Kindler *et al.*, 2013; Schumann *et al.*, 2009) (Figura 1b-c).

As NSPs apresentam diferentes funções, atuando como fatores de virulência, na replicação do genoma e/ou na morfogênese da partícula viral (Desselberger, 2014). A proteína NSP1 (430 a 577 aa), codificada pelo quinto segmento genômico, é considerada um fator de virulência pois promove maior propagação do vírus célula a célula no início da infecção (Caddy *et al.*, 2021). As proteínas NSP2 (282 a 329 aa), codificada pelo oitavo segmento genômico, e NSP5/6 (169 a 218 aa), codificada pelo décimo primeiro segmento genômico, induzem a

formação dos viroplasmas (Desselberger, 2014). Os viroplasmas são estruturas especializadas que interagem com gotículas lipídicas formando corpúsculos de inclusão eletrodensos no citosol (Desselberger, 2014). A proteína NSP3 (303 a 371 aa) codificada pelo sétimo segmento do genoma, atua promovendo a regulação da tradução e subvertendo a síntese de proteínas do hospedeiro para síntese de proteínas virais (Caddy *et al.*, 2021). A proteína NSP4 (168 a 222 aa) codificada pelo décimo segmento de *dsRNA*, em associação com a proteína VP7, formam um complexo na membrana do retículo endoplasmático com funções na replicação viral. Esse complexo também atua como fator de virulência por meio da desestabilização da membrana celular de outras células não infectadas, aumentando a concentração intracelular de íons Ca^{++} , com consequente saída de íons Cl^- e água para o lúmen intestinal, potencializando o quadro de diarreia (Kindler *et al.*, 2013; Patton *et al.*, 2006).

Para RVA foi estabelecido um sistema binário de classificação com base na variabilidade molecular e antigênica dos genes que codificam as proteínas VP4 (genótipo P) e VP7 (genótipo G) (Estes; Kapikian, 2007). Atualmente são descritos na literatura 42 genótipos G e 58 genótipos P em cepas de RVA identificadas em humanos e animais (Tabela 1).

Tabela 1. Produtos genômicos de rotavírus espécie A com seus respectivos valores de ponto de corte para porcentagem de identidade de nucleotídeos, genótipos e quantidade já descrita, bem como a origem da designação dos genótipos baseada na função.

Produto genômico	Valores de ponto de corte para % de identidade de nt	Genótipos (n)	Função
VP7	80	G42	<i>Glycoprotein</i> / Glicoproteína
VP4	80	P[58]	<i>Protease-sensitive</i> / Protease sensível
VP6	85	I32	<i>Inner-capsid</i> / Capsídeo interno
VP1	83	R28	<i>RNA-dependent</i> / RNA-dependente
VP2	84	C24	<i>Core protein</i> / Proteína do núcleo
VP3	81	M24	<i>Methyltransferase</i> / Metiltransferase
NSP1	79	A39	<i>Interferon antagonist</i> / Antagonista de Interferon
NSP2	85	N28	<i>NTPase</i> / NTPase
NSP3	85	T28	<i>Translation enhance</i> / Melhora da tradução
NSP4	85	E32	<i>Enterotoxin</i> / Enterotoxina
NSP5/6	91	H28	<i>Phosphoprotein</i> / Fosfoproteína

Fonte: *Rotavirus Classification Working Group* (2021).
Adaptado de: *Matthijssens et al.* (2008).

Posteriormente, a classificação foi expandida com a inclusão dos outros nove segmentos genômicos de RVA. As sequências dos genes codificadores das proteínas VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/6 foram respectivamente nomeadas em genótipos Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, em que as iniciais desse sistema de classificação foram designadas conforme a função de cada proteína viral (Matthijnssens *et al.*, 2008) (Tabela 1). Um padrão de nomenclatura também foi sugerido para descrever as informações: RVA/espécie animal-origem da identificação (*wt* - cepa selvagem ou *tc* - cultivo celular) / sigla do País conforme IATA (*International Air Transport Association*) / ano de coleta / classificação binária em G e P (Matthijnssens *et al.*, 2011). Quando uma das informações não está disponível é utilizada a letra "X" no local designado para a informação. Esse sistema possibilita classificar os genomas a partir de cada segmento, realizar rastreamento mais efetivo da variabilidade genética, das mutações por ressortimento e da frequência de combinações genotípicas por espécie animal, além de possibilitar o monitoramento de transmissões interespecie e a emergência de novas cepas de RV (Matthijnssens *et al.*, 2008; 2012).

2.2 ROTAVÍRUS AVIÁRIO

Em 1977, por meio de microscopia eletrônica em conteúdo entérico de perus de produção comercial que apresentavam diarreia aquosa e alta mortalidade no estado Dakota do Sul nos Estados Unidos da América, foi descrita pela primeira vez a presença de RV em aves (Bergeland *et al.*, 1978).

Em 1978, foi descrita a presença de RV em granjas de frangos e perus com sinais clínicos de diarreia (Jones *et al.*, 1979; McNulty *et al.*, 1979a). A Tabela 2 apresenta as publicações relacionadas à detecção de RVA em aves.

Tabela 2. Identificação de rotavírus espécie A em espécies aviárias, distribuídas de acordo com o país de origem, espécie aviária, número de amostras avaliadas, frequência de amostras positivas e técnica de detecção.

País	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
		Total	Positivas (%)		
Estados Unidos da América	Peru	NR	NR	M.E	Bergeland <i>et al.</i> , 1978
Reino Unido	Frango e peru	54	7	ME e C. celular	McNulty <i>et al.</i> , 1979a
Reino Unido	Frango	1	1	ME, C. celular, Inoculação, IFI e EGPA	McNulty <i>et al.</i> , 1981
Reino Unido	Frango	11	4 (36,4%)	ME, C. celular, IFI e EGPA	McNulty <i>et al.</i> , 1984
Estados Unidos da América	Frango	3	3	Inoculação e IFD	Yason e Schat, 1986a
Japão	Pomba	55	2	ME, EGPA, C. celular, IFD, HA e HI	Minamoto <i>et al.</i> , 1988
Reino Unido ¹	Frango e peru	2	2	RT-PCR e SEQ	Nishikawa <i>et al.</i> , 1991
Japão	Pato	1	1	ME, EGPA, C. celular e IFD	Takehara <i>et al.</i> , 1991

País	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
		Total	Positivas (%)		
Japão ²	Pomba	1	1	EGPA, ME e ELISA	Brussow <i>et al.</i> , 1992
Reino Unido ¹	Peru e frango	2	2	SEQ	Kool e Holmes, 1993
Alemanha	PO-13 e Bovino 993/83	1	1	SEQ	Rohwedder <i>et al.</i> , 1993
Alemanha ³	PO-13 e Bovino 993/83	1	1	EGPA, ELISA e SEQ	Rohwedder <i>et al.</i> , 1995
Alemanha ² e Japão ³	PO-13 e Bovino 993/83	2	2	ELISA e SEQ	Rohwedder <i>et al.</i> , 1997
Reino Unido ¹ , Alemanha ² e Japão ³	Pomba, frango, peru e Bovino 993/83	5	5	SEQ	Ito <i>et al.</i> , 1997
Japão ²	Pomba	1	1	SEQ GENOMA	Ito <i>et al.</i> , 2001
Reino Unido ¹ e Japão ²	Pomba e peru	2	2	Inoculação e histopatológico	Mori <i>et al.</i> , 2001
Reino Unido ¹	Frango, peru e pomba	3	3	SEQ	Mori <i>et al.</i> , 2002
Reino Unido ¹	Frango, peru e pomba	3	3	EGPA, Inoculação e RT-PCR-RFLP	Mori <i>et al.</i> , 2003
Índia	Frango	75	3 (4%)	ELISA e EGPA	Wani <i>et al.</i> , 2003
Alemanha	Frango de corte	41	28 (68,3%)	ME, EGPA e RT-PCR	Otto <i>et al.</i> , 2006
Índia	Frango de corte	77	2 (2,6%)	EGPA	Savita <i>et al.</i> , 2006

País	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
		Total	Positivas (%)		
Bangladesh	Ave de corte	251	33 (13,1%)	EGPA	Islam <i>et al.</i> , 2009
Alemanha	Frango Ch2G3	1	1	SEQ do genoma	Trojnar <i>et al.</i> , 2009
Alemanha e Reino Unido	Linhagens de frango, peru e pomba	9	9	EGPA e SEQ	Schumann <i>et al.</i> , 2009
Europa e Bangladesh	Frango corte e peru corte	592	263 (44,4%)	EGPA, RT-PCR e RT-qPCR	Otto <i>et al.</i> , 2012
Itália	Frango, peru e faisão	117	70 (59,8%)	ME, EGPA, RT-PCR e SEQ	Falcone <i>et al.</i> , 2015
Reino Unido ¹	Linhagens de perus	2	2	SEQ do genoma	Fujii <i>et al.</i> , 2016
Nigeria	Ave de produção, frango, faisão, peru, pato e codorna	349	126 (36,1%)	RT-PCR e SEQ	Pauly <i>et al.</i> , 2017
Alemanha	Frango, peru e faisão	3	3	SEQ do genoma	Trojnar <i>et al.</i> , 2013
EUA	Pomba	1	1	SEQ do genoma	Basham <i>et al.</i> , 2022
Alemanha e Reino Unido	Frango	4	4	NGS	Patzina-Mehling <i>et al.</i> , 2020

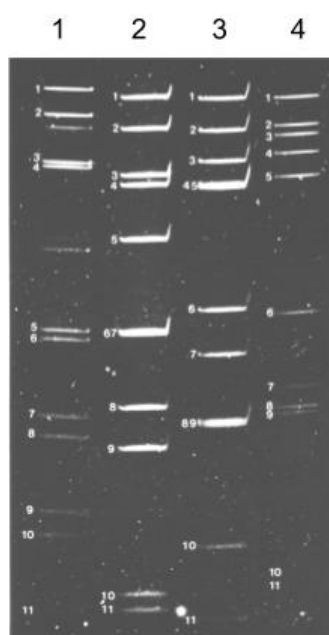
Amostras já publicadas previamente ¹ McNulty *et al.*, 1979; ² Minamoto *et al.*, 1988; ³ Rohwedder *et al.*, 1993; Bovino 993/83 = linhagem de

País	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
		Total	Positivas (%)		

rotavírus espécie A aviária detectada em bovino; C. celular = cultivo celular e isolamento; EGPA = eletroforese em gel de poliacrilamida; ELISA = Ensaio imunoenzimático; HA = hemaglutinação; HI = inibição da hemaglutinação; IFI = imunofluorescência indireta; IFD = imunofluorescência direta; NR = não relatado; ME = microscopia eletrônica; PO-13 = linhagem de rotavírus espécie A de pomba do Japão; RFLP = Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) RT-qPCR = RT-PCR quantitativa; SEQ = Sequenciamento; NGS = sequenciamento de próxima geração (*Next Generation Sequencing*).

As quatro espécies de RV que acometem as aves foram detectadas e caracterizadas pela primeira vez em frangos de corte do Reino Unido utilizando a técnica de EGPA, neste estudo foi possível identificar infecções singulares e mistas (Figura 2) (McNulty *et al.*, 1984a).

Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida demonstrando os 11 segmentos genômicos dsRNA nomeados de 1 a 11 das quatro espécies de rotavírus identificadas em aves. Canaleta 1: rotavírus G (RVG) (cepa 555), Canaleta 2: rotavírus F (RVF) (cepa A4), Canaleta 3: rotavírus D (RVD) (cepa Ch 132) e Canaleta 4: rotavírus A (RVA) (cepa Ch 1).



Adaptado de: McNulty *et al.* (1984a).

As espécies de RV A, D, F e G já foram identificadas em diferentes espécies de aves, sendo que as espécies D, F e G foram detectadas exclusivamente em aves (Day; Zsack, 2013). As espécies de RV aviário de maior ocorrência são RVA e RVD (Otto *et al.*, 2012; Pauly *et al.*, 2017). As identificações das espécies RVD, RVF e RVG em hospedeiros aviários no mundo (exceto Brasil) estão apresentadas na tabela 3.

Tabela 3. Descrições de rotavírus espécies D, F e G em espécies aviárias no mundo (exceto Brasil), relacionadas de acordo com o país, número de amostras avaliadas e frequência de amostras positivas e técnica de detecção utilizada.

País	Espécie de rotavírus	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
			Total	Positivas (%)		
Reino Unido	A, D, F e G	Frango	88	27 (30,7%)	ME, C. celular, inoculação, IF e EGPA	McNulty <i>et al.</i> , 1984
EUA	D	Peru	–	–	IFI, EGPA e ME	Yason e Schat, 1985
Reino Unido ¹	D-132	Frango	1	1	EGPA, IFI e SEQ	Pedley <i>et al.</i> , 1986
EUA	D-132	Frango e peru	7	7	ME, e EGPA	Theil <i>et al.</i> , 1986
EUA	D	Frango e peru	3	3	C. celular, inoculação, titulação e histopatológico	Yason e Schat, 1986b
Reino Unido	A, D, F e G	Frango e peru	12	5 (41,7%)	C. celular e EGPA	Todd <i>et al.</i> , 1986
EUA	F	Peru	40	35 (87,5%)	ME, C. celular, SN e EGPA	Kang <i>et al.</i> , 1986
Alemanha	A, D, F e G	Frango de corte	41	57*	ME, EGPA e RT-PCR	Otto <i>et al.</i> , 2006
Bangladesh	D	Frango de corte	630	87 (13,8%)	EGPA	Karim <i>et al.</i> , 2007
Índia	A, D	frango de corte	77	7 (9,1%)	EGPA	Savita <i>et al.</i> , 2008
Bangladesh	D	Frango de	251	33 (13,1%)	EGPA	Islam <i>et al.</i> , 2009

País	Espécie de rotavírus	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
			Total	Positivas (%)		
Alemanha	D	Frango de corte	1	1	ME, EGPA, RT-PCR-FLAC e SEQ do genoma	Trojnar <i>et al.</i> , 2010
Índia	D	Frango de corte	54	4 (7,4%)	EGPA e RT-PCR	Niture <i>et al.</i> , 2010
Alemanha ²	F e G	Frango de corte	2	2	ME, EGPA, RT-PCR e SEQ	Johne <i>et al.</i> , 2011
Alemanha ²	F e G	Frango de corte	2	2	RT-PCR e SEQ	Ogden <i>et al.</i> , 2012
Europa e Bangladesh	A, D, F e G	Frango e peru de corte	592	425 (71,8%)	RT-PCR, SEQ e RT-qPCR	Otto <i>et al.</i> , 2012
Alemanha ²	F e G	Frango de corte	2	2	SEQ do genoma	Kindler <i>et al.</i> , 2013
Índia	D	Frango de corte	42	2 (4,8%)	EGPA, RT-PCR e SEQ	Kattoor <i>et al.</i> , 2013
Itália	A, D, F e G	Frango, peru e faisão	117	199*	ME, EGPA, RT-PCR e SEQ	Falcone <i>et al.</i> , 2015
Hong Kong	G	Pomba	51	5 (9,8%)	Metagenômica	Phan <i>et al.</i> , 2013
Nigéria	A e D	Ave de produção, frango, faisão,	349	111 (31,8%) RVD	RT-PCR e SEQ	Pauly <i>et al.</i> , 2017

País	Espécie de rotavírus	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
			Total	Positivas (%)		
Equador	A	peru, pato e codorna Frango de corte	4	4	RT-PCR e RT-qPCR	De la Torre <i>et al.</i> , 2018

Amostras já publicadas previamente ¹ McNulty *et al.*, 1984; ² Otto *et al.*, 2006; *Coinfecção dupla ou múltipla de rotavírus por amostra; C. celular = cultivo celular e isolamento; EGPA = eletroforese em gel de poliacrilamida; ELISA = ensaio imunoenzimático; HA = hemaglutinação; HI = inibição da hemaglutinação; IFI = imunofluorescência indireta; IFD = imunofluorescência direta; NR = não relatado; ME = microscopia eletrônica; PO-13 = linhagem de rotavírus espécie A de pomba do Japão; RT-PCR-FLAC = RT-PCR *method full-length amplification of cDNA* ; RT-qPCR= RT-PCR quantitativa; SEQ = sequenciamento; SN = soroneutralização; NGS = sequenciamento de próxima geração (*next generation sequencing*).

No Brasil, a primeira identificação de RV aviário foi realizada por Alfieri *et al.* (1989) em amostras de excretas de frangos de corte com sinais clínicos de enterite, depressão e anorexia. As descrições de RV aviário realizadas no Brasil referente a espécie A e espécies D, F e G são apresentadas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

No Brasil, além da descrição inicial realizada por Alfieri *et al.* (1989) a presença de RV já foi descrita em excretas de frangos de corte, poedeiras, matrizes de corte, e avozeiros, apresentando ou não sinais clínicos de enterite (Beserra; Gregori, 2014; Beserra *et al.*, 2014; Beserra *et al.*, 2020; Bezerra *et al.*, 2014; Gallego *et al.*, 2022; Mascarenhas *et al.*, 2016; Mettifogo *et al.*, 2014 Pinheiro *et al.*, 2022; Tamehiro *et al.*, 2003). Recentemente, RV foi identificado pela primeira vez em aves silvestres como gaivota, gavião, sabiá, curió, papagaio, canário, tucano, calopsita e outras aves de comportamento migratório como o Pilrito-semipalmado (Barros *et al.*, 2018; Duarte *et al.*, 2020; Guerreiro *et al.*, 2018).

Tabela 4. Rotavírus espécie A em espécies aviárias no Brasil, distribuídas de acordo com o estado, número de amostras avaliadas e frequência de amostras positivas e técnica de detecção utilizada

Estados	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
		Total	Positivas (%)		
PR	Frango de corte	NR	NR	EGPA	Alfieri <i>et al.</i> , 1989
PR	Frango de corte	378	32 (8,5%)	EGPA	Tamehiro <i>et al.</i> , 2003
PR, SC, RS, RJ, SP, MG, PA e CE	Frango de corte	128	58 (45,3%)	EGPA e C. celular	Villarreal <i>et al.</i> , 2006
PR	Peru	NR	6	RT-PCR	Asano <i>et al.</i> , 2011
PR	Avestruz	66	6 (9,1%)	EGPA e RT-PCR	Silva <i>et al.</i> , 2012
PA	Frango de corte	85	35 (41,2%)	RT-PCR	Silva <i>et al.</i> , 2013
SC, MG e GO	Peru	76	40 (52,6%)	RT-PCR	Moura-Alvarez <i>et al.</i> , 2013
PR, SC, RS, SP, RJ, MG, GO e CE	Frango de corte, matriz e poedeira	280	48 (17,1%)	RT-PCR	Mettifogo <i>et al.</i> , 2014
SP, PR, SC, RS e GO	Frango de corte, poedeira e matriz	39	21 (53,8%)	RT-PCR e SEQ	Beserra <i>et al.</i> , 2014

Estados	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
		Total	Positivas (%)		
PA	Aves silvestres e domésticas	147	42 (28,6%)	RT- <i>q</i> PCR	Barros <i>et al.</i> , 2018
SP	Frango de corte	20	20	RT-PCR e RT- <i>q</i> PCR	De la Torre <i>et al.</i> , 2018
PR, RS, SP e PE	Frango de corte e poedeira	40	8 (20%)	RT-PCR e SEQ	Beserra <i>et al.</i> , 2020
PA	Aves silvestres	23	9 (39,1%)	RT-PCR, RT- <i>q</i> PCR e SEQ	Duarte <i>et al.</i> , 2020
PR	Frango de corte	256	9 (3,5%)	EGPA e RT-PCR	Gallego <i>et al.</i> , 2022

C. celular = cultivo celular; EGPA = eletroforese em gel de poliacrilamida; NR = não relatado; RT-*q*PCR = RT-PCR quantitativa; SEQ = sequenciamento.

Tabela 5. Identificação de rotavírus espécies D, F e G em espécies aviárias no Brasil, distribuídas de acordo com o local da identificação, número de amostras avaliadas e porcentagem de amostras positivas e técnica de detecção utilizada.

Estados	Espécie de rotavírus	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
			Total	Positivas (%)		
PR	D e F	Frango de corte	378	10 (2,6%)	EGPA e C. celular	Tamehiro <i>et al.</i> , 2003
PA	D	Frango de corte	30	16 (53,3%)	EGPA, RT-PCR, CLON e SEQ	Bezerra <i>et al.</i> , 2012
CE, BA, ES, SP, PR, SC, RS e GO	F	Frango e matriz de corte, avozeiros e poedeiras	53	3 (5,7%)	RT-PCR e SEQ	Beserra <i>et al.</i> , 2014
PA	D	Frango de corte	85	30 (35,3%)	EGPA, RT-PCR e SEQ	Bezerra <i>et al.</i> , 2014
PR, SC, RS, SP, ES, GO, BA e CE	D	Frango de corte, matriz de corte, poedeira	111	4 (3,6%)	RT-PCR	Beserra <i>et al.</i> , 2015
PA	F e G	Frango de corte	85	17 (20%)	EGPA, RT-PCR e SEQ	Mascarenhas <i>et al.</i> , 2016
CE, PE, GO, MG, MS, SP, PR, SC e RS	F e G	Frango de corte, matriz de corte e poedeira	97	6 (6,2%)	RT-PCR e SEQ	Scuarcialupi <i>et al.</i> , 2017
PA	D	Aves silvestres	23	1 (4,3%)	EGPA, RT-PCR e SEQ	Guerreiro <i>et al.</i> , 2018
PA	A, D e F	Aves silvestres	23	1* (4,3%)	EGPA, RT-PCR, SEQ e RT-qPCR	Duarte <i>et al.</i> , 2020

Estados	Espécie de rotavírus	Espécie aviária	Nº de amostras avaliadas		Técnica	Referência
			Total	Positivas (%)		
PR	A, D e F	Frango de corte	256	60 (23,4%)	EGPA e RT-PCR	Gallego <i>et al.</i> , 2022
RJ e ES	F e G	Frango de corte e poedeira	325	38 (11,7%)	RT-PCR e SEQ	Pinheiro <i>et al.</i> , 2022

*Coinfecção dupla ou múltipla de rotavírus por amostra; C. celular = cultivo celular; CLON = clonagem; EGPA = eletroforese em gel de poliacrilamida; RT-qPCR= RT-PCR em tempo real; SEQ = sequenciamento.

RV já foi amplamente identificado em aves de produção tais como frangos de corte (McNulty *et al.*, 1984b; Otto *et al.*, 2012), poedeiras (Karim *et al.*, 2007) e matrizes (Mettifogo *et al.*, 2014; Villarreal *et al.*, 2006), além de perus (Pantin-Jackwood *et al.*, 2007; Yason; Schat, 1987), faisões (Ursu *et al.*, 2009), avestruzes (Silva *et al.*, 2012), codornas e pombas (Pauly *et al.*, 2017). Os relatos de detecção de RV variam desde infecções subclínicas a quadros clínicos de enterite com gravidade variável (Dhama *et al.*, 2015; Mettifogo *et al.*, 2014; Ursu *et al.*, 2009). A transmissão via ovo ainda não foi comprovada e é mais provável que RV permaneça viável no ambiente produtivo uma vez que a partícula viral apresenta grande estabilidade e resistência facilitando a transmissão fecal-oral e por fômites (Dhama *et al.*, 2015; Theil e Saif, 1987).

Ao passar pelo intestino delgado do hospedeiro, RVs encontram os receptores nos enterócitos maduros da região apical das vilosidades (Estes; Kapikian, 2007). O ciclo infeccioso inicia com as proteínas VP4 e VP7 presentes na camada externa do capsídeo, se ligando aos receptores presentes nas glicoproteínas na superfície celular do hospedeiro (Estes; Kapikian, 2007). O fim do ciclo replicativo culmina com a liberação das partículas virais maduras das células hospedeiras por lise ou exocitose (Desselberger, 2014). Este processo de replicação leva a lise dos enterócitos maduros e, conseqüentemente, atrofia das vilosidades, reduzindo a absorção de nutrientes e eletrólitos causando má absorção, má digestão e retenção osmótica de água no lúmen intestinal (Estes; Kapikian, 2007).

Em granjas comerciais, RV também está relacionado, juntamente com outros agentes etiológicos virais, à síndrome da má absorção - SMA (*MAS - Malabsorption Syndrome*) (Songserm *et al.*, 2000; Rebel *et al.*, 2006). Esta síndrome já foi descrita com outros nomes tais como *Helicopter disease* (Kouwenhoven *et al.*, 1978a), *Infectious proventriculitis* (Kouwenhoven *et al.*, 1978b), *Brittle bone disease* (Van der Heide *et al.*, 1981), *Pale bird syndrome* (Good *et al.*, 1982), *Infectious stunting syndrome* (Bracewell, 1984) e *Runting-stunting Syndrome* (RSS) (McNulty *et al.*, 1984; Otto *et al.*, 2006). Experimentos controlados realizados *in vivo* com a administração de suspensão oral de inóculos provenientes de aves com SMA em aves híidas indicam a provável etiologia da SMA relacionada a agentes etiológicos virais não envelopados como parvovírus, astrovírus, reovírus, adenovírus e enterovírus, mas nunca atuando de forma isolada (Kang *et al.*, 2012; Rebel *et al.*, 2006). Na SMA, os principais sinais clínicos descritos são o retardo do crescimento das aves e

desenvolvimento lento das penas, letargia, excretas mucoides aderidas à cloaca, mucosas pálidas e anormalidades ósseas (Rebel *et al.*, 2006). Nos aviários com presença da SMA relata-se alta taxa de descarte, baixo ganho de peso e desuniformidade das aves, perda da qualidade de carcaça e maior acometimento das aves devido à presença de doenças secundárias como coccidiose e salmonelose (Qmar *et al.*, 2013).

2.2.1 Rotavírus aviário espécie A

O primeiro genoma completo de RVA aviário descrito foi da cepa denominada PO-3, identificada no Japão em excreta de pomba, onde foram identificados os genótipos G18-P[17]-I4 (Ito *et al.*, 2001). Na Alemanha, o primeiro genoma completo de RVA foi obtido a partir da cepa detectada em conteúdo entérico de frangos de corte com SMA na qual foram identificados os genótipos G19-P[30]-I11 (Trojnar; Otto; Johne, 2009). Ainda na Alemanha foram identificados os genótipos G19-P[30]-I11 e G19-P[31]-I11 em frangos e os genótipos G22-P[35]-I4 em perus com sinais clínicos de diarreia e SMA (Schumann *et al.*, 2009). Na Irlanda do Norte foram identificados os genótipos G7P[35]-I4 e G17P[38]-I4 em excretas de perus com diarreia (Fujii *et al.*, 2016; McNulty *et al.*, 1979a). A combinação de genótipos G23-P[37]-I4 foi identificada em um faisão com diarreia na Alemanha (Trojnar *et al.*, 2013). Com sequenciamento parcial dos genes VP6, VP7 e VP4 foram identificados os genótipos G18-P[17]-I4 em pombas e frangos e os genótipos G19-P[31]-I11 em frangos e faisões da Nigéria (Pauly *et al.*, 2017). As descrições dos genótipos G, P e I de RVA aviário realizadas no Mundo são apresentadas na Tabela 6.

No Brasil um estudo realizado com amostras provenientes de frangos de corte e postura sem sinais clínicos de diarreia, demonstrou 53% (21/39) de positividade nos *pools* amostrados das regiões sul e sudeste do país. A análise por RT-PCR identificou os genótipos G5, G8, G11, G19 e P[31] (Beserra *et al.*, 2014).

Entre 2008 e 2015, nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul, São Paulo e Pernambuco foram coletadas 40 amostras de conteúdo entérico de frangos de corte e poedeiras. Em oito amostras foi possível realizar RT-PCR, sequenciamento dos *amplicons* e análise das sequências nas quais foram identificados os genótipos G19-P[31]-I11 e G19-P[31]-I4 (Beserra *et al.*, 2020). Os genótipos G, P e I descritos em espécies aviárias no Brasil são apresentados na Tabela 7.

Tabela 6. Genótipos G (VP7), P (VP4) e I (VP6) de rotavírus espécie A identificados em aves distribuídos conforme o local da identificação e espécie aviária.

País	Espécie aviária	Genótipos			Referência
		G (VP7)	P (VP4)	I (VP6)	
Reino Unido ¹	Frango de corte	G7	P[X]	IX	Nishikawa <i>et al.</i> , 1991
Reino Unido ¹	Peru	G17	P[X]	IX	Kool e Holmes, 1993
Reino Unido ¹ , Japão ² e Alemanha ³	Pomba, frango, peru e Bovino 993/83	GX	P[X]	I4	Ito <i>et al.</i> , 1997
Japão ²	Pomba PO-13	G18	P[17]	I4	Ito <i>et al.</i> , 2001
Alemanha	Frango de corte	G19	P[30]	I11	Schumann <i>et al.</i> , 2009
		G19	P[31]	I11	
		G7	P[X]	I4	
	Peru	G22	P[35]	I4	
Alemanha ⁴	Frango de corte	G19	P[30]	I11	Trojnar <i>et al.</i> , 2009
Hungria	Faisão	G23	P[X]	IX	Ursu <i>et al.</i> , 2009
Coreia	Frango de corte	G19	P[30]	IX	Wang <i>et al.</i> , 2013
Alemanha	Faisão	G23	P[37]	I4	Trojnar <i>et al.</i> , 2013

Alemanha ¹	Peru	G17	P[38]	I4	Fujii <i>et al.</i> , 2016
		G7	P[35]	I4	
Nigeria	Pomba e frango de corte	G18	P[17]	I4	Pauly <i>et al.</i> , 2017
		G19	P[31]	I11	
Japão	Pato	G18	P[17]	I4	Fujii <i>et al.</i> , 2022a
Japão	Gaivota	G28	P[39]	I21	Fujii <i>et al.</i> , 2022b
Alemanha e Reino Unido	Frango	G19	P[30]	I11	
		G19	P[31]	I11	Patzina-Mehling <i>et al.</i> , 2020

Amostras já publicadas previamente ¹ McNulty *et al.*, 1979; ² Minamoto *et al.*, 1988; ³ Rohwedder *et al.*, 1993 ⁴ Otto *et al.*, 2006; PO-13 = linhagem de rotavírus espécie A de origem de pomba; 993/83 = linhagem de rotavírus espécie A de origem aviária detectado em bovino.

Tabela 7. Genótipos G (VP7), P (VP4) e I (VP6) de rotavírus espécie A identificados em aves no Brasil distribuídos conforme o local da identificação e espécie aviária.

Estados	Espécie Aviária	Genótipos			Referência
		G (VP7)	P (VP4)	I (VP6)	
PR	Peru	G6	P[1]	IX	Asano <i>et al.</i> , 2011
PR	Avestruz	G6	P[1]	IX	Silva <i>et al.</i> , 2012
		G10	P[1]	IX	
		GX	P[7]	IX	
		G5	P[X]	IX	
RS, SC, PR, SP e GO	Frango de corte, matriz de corte e poedeira	G8	P[X]	IX	Beserra <i>et al.</i> , 2014
		G11	P[X]	IX	
		G19	P[31]	IX	
		GX	P[4]	IX	
PA	Aves silvestres e de produção	GX	P[4]	IX	Barros <i>et al.</i> , 2018
PE, SP, PR e RS	Frango de corte e poedeira	G19	P[31]	I11	Beserra <i>et al.</i> , 2020
		G19	P[31]	I4	

PA

Aves silvestres

G1

P[2]

IX

Duarte *et al.*, 2020

G3

P[2]

IX

G6

P[X]

IX

2.2.2 Rotavírus aviário espécies D, F e G

Rotavírus espécie D foi identificado pela primeira vez por meio da técnica de ELISA (McNulty *et al.*, 1984) e, posteriormente, por outras técnicas como EGPA (Pedley *et al.*, 1986; Theil; Reynolds; Saif, 1986), microscopia eletrônica de transmissão (Theil; Reynolds; Saif, 1986) e cultivo celular (Devitt; Reynolds, 1993). A patogenicidade da espécie RVD foi avaliada pela primeira vez por meio de inoculação de amostras positivas em faisão, ocorrendo doença clínica e alterações histopatológicas no intestino delgado (Haynes *et al.*, 1994).

O primeiro genoma completo de RVD foi descrito na Alemanha em uma amostra biológica proveniente de frango de corte com sinais clínicos da SMA (Trojnar *et al.*, 2010). Estudos com objetivo de identificar a ocorrência de RVD já foram realizados na Índia (Savita *et al.*, 2008; Niture *et al.*, 2010; Kattoor *et al.*, 2013), Nigéria (Pauly *et al.*, 2017), Alemanha, Suécia e Reino Unido (Otto *et al.*, 2012). No Brasil, esta espécie de RV já foi detectada em amostras provenientes de frango de corte nos estados do Pará (Bezerra *et al.*, 2012; Bezerra *et al.*, 2014), Goiás, São Paulo (Beserra *et al.*, 2015) e Paraná (Beserra *et al.*, 2015; Gallego *et al.*, 2022).

As espécies F e G de RV foram descritas pela primeira vez em 1984 em excretas de frangos de corte submetidas à técnica de EGPA e diferenciadas das outras duas espécies (A e D) previamente descritas por apresentarem diferentes padrões de migração dos segmentos genômicos (McNulty *et al.*, 1984). Os genomas completos de RVF e RVG foram descritos posteriormente (Johne *et al.*, 2011; Kindler *et al.*, 2013) a partir de cepas de RV provenientes de conteúdo entérico de frangos de corte comerciais na Alemanha, previamente analisadas por EGPA (Otto *et al.*, 2006). A espécie RVG já foi detectada em pombas selvagens em Hong Kong por meio de metagenômica (Phan *et al.*, 2013).

No Brasil, RVF já foi detectado utilizando RT-PCR para o gene VP6 em 9,4% (5/53) dos *pools* de amostras de excretas de frangos sem diarreia com idade entre 40 dias a 11 meses. As amostras eram provenientes de oito estados (Ceará, Bahia, Espírito Santo, Goiás, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) e as amostras RVF positivas eram dos estados de São Paulo e Paraná (Beserra e Gregori, 2014).

No estado do Pará, RVF e RVG foram detectados por RT-PCR para o gene VP6 em 9,4% (8/85) e 10,6% (9/85) dos *pools* de amostras de cama de aviário de frangos de corte com idade entre 15 a 45 dias, respectivamente (Mascarenhas *et al.*, 2016). No estado do Paraná, a presença de RVF foi descrita em frangos de corte com idade entre 7 e 14 dias com sinais clínicos da SMA. Das 256 amostras de conteúdo individual coletadas, 33 (12,9%) foram positivas para RVF por meio da técnica de EGPA (Gallego *et al.*, 2022). Este percentual de amostras positivas difere do obtido por outros autores que sugerem que a baixa detecção da espécie RVF ocorre devido a excreção viral em baixos títulos (Mascarenhas *et al.*, 2016; Otto *et al.*, 2012).

Na região sudeste do Brasil, nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, um estudo detectou RVF e RVG em excretas de frangos de corte e poedeiras sem SMA e/ou diarreia no momento da coleta. Neste estudo, das 325 amostras analisadas por RT-PCR para o gene VP6, 35 (10,8%) e 3 (0,9%) foram positivas para RVF e RVG, respectivamente (Pinheiro *et al.*, 2022).

Ao analisar as sequências de nt levando em consideração a filogenia é possível verificar que ocorre uma evolução independente das espécies de RVA, RVD e RVF, enquanto a espécie RVG segrega em um clado junto com as espécies RVB e RVH descritas em mamíferos (Beserra; Gregori, 2014; Johne *et al.*, 2011; Kindler *et al.*, 2013; Mascarenhas *et al.*, 2016; Ogden *et al.*, 2012).

2.3 COINFECÇÕES

O primeiro estudo que detectou coinfeção com duas espécies de RV em aves ocorreu em 2012, com amostras biológicas de 541 aves de produção com diarreia e SMA de sete países da Europa e Bangladesh. Neste estudo, primeiramente foram utilizadas as técnicas de EGPA, microscopia eletrônica e RT-PCR para o gene VP6 onde foi possível detectar 11,1% de coinfeções entre RVA e RVD em 199 amostras analisadas. Posteriormente, 393 amostras foram analisadas utilizando a técnica de *q*RT-PCR foi possível detectar um percentual superior (38,9%) de coinfeções (Otto *et al.*, 2012).

Na Nigéria, utilizando RT-PCR para os genes VP6 e VP7 foi possível relatar coinfeção entre as espécies RVA e RVD em 15,2% (53/349) das amostras analisadas provenientes de aves de produção como frango de corte, faisão, pato, pomba e codorna (Pauly *et al.*, 2017).

No Brasil, em um estudo conduzido na região Sul com amostras de

excretas de aves de produção, com idade variando de 40 dias a 11 meses, sem diarreia foram identificados RVA e RVF em um *pool* de excretas de aves do mesmo lote utilizando a técnica de RT-PCR para os genes VP6, VP4 e VP7 (Beserra; Gregori, 2014).

No estado do Pará, RVA, RVD e RVF foram detectados por RT-PCR para os genes VP6 (RVD e RVF) e NSP4 (RVA) em excretas de uma Curica (*Amazona amazonica*) com claudicação, atrofia de membros e diarreia (Duarte *et al.*, 2020). Os estudos apresentados evidenciam o potencial das mutações por ressortimento quando duas espécies diferentes de RV coinfectam o mesmo hospedeiro animal (Duarte *et al.*, 2020; Otto *et al.*, 2012; Pauly *et al.*, 2017).

2.4 REFERÊNCIAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual, 2022. Disponível em: <<https://abpa-br.org/mercados/#relatorios> > Acesso em: 30 junho de 2022.

ALFIERI, A.F.; RESENDE, M.; RESENDE, J.S.; ALFIERI, A.A. Atypical rotavirus infections among broiler chickens in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.41, p.81-82, 1989.

ASANO, K.M.; GREGORI, F.; SOUZA, S.P.; ROTAVA, D.; OLIVEIRA R.N.; VILLAREAL, L.Y.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Bovine rotavirus in turkeys with enteritis. **Avian Diseases**, v.55, n.4, p.697-701, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1637/9765-041911-ResNote.1>

BÁNYAI, K.; KEMENESI, G.; BUDINSKI, I.; FÖLDES, F.; ZANA, B.; MARTON, S.; VARGA-KUGLER, R.; OLDAL, M.; KURUCZ, K.; JAKAB, F. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. **Infection, Genetics and Evolution**, v.48, p.19-26, 2017. DOI: <https://10.1016/j.meegid.2016.12.002>.

BARROS, B.D.C.V.D.; CHAGAS, E.N.; BEZERRA, L.W.; RIBEIRO, L.G.; DUARTE JÚNIOR, J.W.B.; PEREIRA, D.; PENHA, E.T.J.; SILVA, J.R.; BEZERRA, D.A.M.; BANDEIRA, R.S.; PINHEIRO, H.H.C.; GUERRA, S.F.S.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; MASCARENHAS, J.P. Rotavirus A in wild and domestic animals from areas with environmental degradation in the Brazilian Amazon. **PLoS ONE**, v.13, n.12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209005>

BASHAM, R.A.; DILL-OKUBO, J.; SUBRAMANIAM, K.; WALTZEK, T.B.; VIADANNA, P.H.O. Genome Sequence of Rotavirus A from a Florida Racing Pigeon (*Columba livia domestica*). **Veterinary Microbiology**, v.11, p1-3. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/mra.01149-21>

BERGELAND, M.E. Causes of mortality in poultry submitted to the animal disease research and diagnostic laboratory, July 1977 - June 1978. *In*: SOUTH DAKOTA

POULTRY FIELD DAY, 10., 1978, Brookings. **Proceedings** [...]. Brookings: South Dakota State University, 1978, p.16-18.

BERGELAND, M.E.; MCADARAGH, J.P.; STOTZ, I. Rotaviral enteritis in turkey poult. *In*: WESTERN POULTRY DISEASES CONFERENCE, 26., 1977, Davis. **Proceedings** [...]. Davis: University of California, 1977. p.120-129.

BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, C.M.; BERG, M.; BRANDÃO, P.E.; SOARES, R.M.; GREGORI, F. Genome constellations of rotavirus a isolated from avian species in Brazil, 2008–2015. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.51, p.1363-1375, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00259-4>

BESERRA, L.A.R; GREGORI, F. Description of rotavirus F in broilers from Brazilian poultry farms. **Avian Diseases**, v.58, p. 458-461, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1637/10747-121613-ResNote.1>

BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, B.R.P; BERNARDES, N.T.C.G.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F. Occurrence and Characterization of Rotavirus A in Broilers, Layers, and Broiler Breeders from Brazilian Poultry Farms. **Avian Diseases**, v.58, p.153-154, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/10626-080513-ResNote.1>

BESERRA, L.A.R.; BERNARDES, N.T.C.G.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F. Monitoring and molecular characterization of group D rotavirus in Brazilian poultry farms. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.6, p.536-540, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X201500600008>

BRACEWELL, C.D.; RANDALL, C.J. The infectious Stunting Syndrome. **World's Poultry Science Journal**. v.40, p.31-37, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1079/WPS19840004>

BRUSSOW, H.; NAKAGOMI, O.; GERNA, G.; EICHHORN, W. Isolation of an Avian like Group A Rotavirus from a Calf with Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p. 67-73, 1992. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.30.1.67-73.1992>

BURAGOHAIN, M.; CHERIAN, S.S.; PRABHAKAR, G.; CHITAMBAR, S.D. VP6 capsid protein of chicken rotavirus strain CH2: sequence, phylogeny and in silico antigenic analyses. **Virus Research**, v.137, n.2, p.173-178, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.07.008>

BEZERRA, D.A.M.; 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. **Journal of Virological Methods**, v.185, n.2, p.189-192, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.017>

BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; KAIANO, J.H.L.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P. Detection, epidemiology and characterization of VP6 and VP7 genes of group D rotavirus in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.43, n.3, p.238-243, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2014.913097>

CADDY, S.; PAPA, G.; BORODAVKA, A.; DESSELBERGER, U. Rotavirus research: 2014-2020. **Virus Research**, v.304, p.1-21, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198499>

CRAWFORD, S.; RAMANI, S.; TATE, J.; PARASHAR, U.D.; SVENSSON, L.; HAGBOM, M.; FRANCO, M.A.; GREENBERG, H.B.; O'RYAN, M.; KANG, G.; DESSELBERGER, U.; ESTES, M.K. Rotavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v.3, p.1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>

DAY, J.M.; ZSAK, L. Recent progress in the Characterization of avian enteric viruses. **Avian Diseases**, v. 57, p. 573-580, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1637/10390-092712-Review.1>

DE LA TORRE, D.; FERREIRA-ASTOLFI, C.S.; CHACON, R.D.; FERREIRA, A.J.P. Sensitive SYBR Green—Real Time PCR for the Detection and Quantitation of Avian Rotavirus A. **Veterinary Sciences**, v.6, n.2, p.2-9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci6010002>

DESSELBERGER, U. Rotaviruses. **Virus Research**, v.190, p. 75-96, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>.

DEVITT, C.; REYNOLDS, D. Characterization of a group D rotavirus. **Avian Diseases**, v.37, n.3, p.749-755, 1993. DOI: <https://doi.org/10.2307/1592024>

DHAMA, K.; SAMINATHAN, M.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; SHABBIR, M.Z.; KUMAR, N.; MALIK, Y.S.; SINGH, R.K. Avian rotavirus enteritis - an updated review. **Veterinary Quarterly**, v.35, n.3, p.142-158, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2015.1046014>

DUARTE JÚNIOR, J.W.B.; CHAGAS, E.H.N.; SERRA, A.C.S.; SOUTO, L.C.S.; PENHA JÚNIOR, E.T.; BANDEIRA, R.S.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; OLIVEIRA, H.G.S.; SOUSA, T.K.S.; LOPES, C.T.A.; DOMINGUES, S.F.S.; PINHEIRO, H.H.C.; MALIK, Y.S.; SALVARANI, F.M.; MASCARENHAS, J.D.P. Occurrence of rotavirus and picobirnavirus in wild and exotic avian from amazon forest. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.15, n.9, p.1-18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008792>

ESTES, M.; KAPIKIAN, A. Rotaviruses. *In*: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; LAMB, R.A.; MARTIN, M.A.; ROIZMAN, B. STRAUS, S.E. **Fields Virology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. p.1917-1974.

FALCONE, E.; BUSI, C.; LAVAZZA, A.; MONINI, M.; BERTOLETTI, M.; CANELLI, E.; VIGNOLO, E.; RUGGERI, F.M.; BONIOTTI, M.B. Molecular characterization of avian rotaviruses circulating in Italian poultry flocks. **Avian Pathology**, v.44, p.509-515, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2015.1096011>

FALKENHAGEN, A.; PATZINA-MEHLING, C.; RÜCKNER, A.; VAHLENKAMP, T.W.; JOHNE, R. Generation of simian rotavirus reassortants with diverse VP4 genes using reverse genetics. **Journal of General Virology**, v.100, p.1595-1604, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001322>

FUJII, Y.; MITAKE, H.; YAMADA, D.; NAGAI, M.; OKADERA, K.; ITO, N.; OKADA, K.; NAKAGAWA, K.; MIZUTANI, T.; SUGIYAMA, M. Genome sequences of rotavirus A strains Ty-1 and Ty-3, isolated from turkeys in Ireland in 1979. **Genome Announcements**, v.4, n.1, p.1-2, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.01565-15>

FUJII, Y.; MASATANI, T.; NISHIYAMA, S.; OKAJIMA, M.; IZUMI, F.; OKAZAKI, K.; SAKODA, Y.; TAKADA, A.; OZAWA, M.; SUGIYAMA, M.; ITO, N. Molecular characterisation of a novel avian rotavirus A strain detected from a gull species (*Larus* sp.). **Journal of General Virology**, v. 103, n.10, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001792>

FUJII, Y.; HIRAYAMA, M.; NISHIYAMA, S.; TAKAHASHI, T.; OKAJIMA, M.; IZUMI, F.; TAKEHARA, K.; MASATANI, T.; SUGIYAMA, M.; ITO, N. Characterization of an avian rotavirus A strain isolated from A velvet scoter (*Melanitta fusca*): implication for the role of migratory birds in global spread of avian rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.103, n.2, 2022a. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001722>

GALLEGO, J.C.; LORENCENA, D.; DE MELLO, J.L.; DELAI, R.R.; DE MATOS, M.R.; VIOTT, A.M.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A.A.; FERNANDES, S.R.; TAKIUCHI, E. Investigation of avian rotavirus infections in broiler chicks from commercial flocks with different performance efficiency indexes. **Veterinary Research Communications**, v. 46, p. 853-858, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09910-x>

GOOD, R.E. The pale bird syndrome. **Poultry Digest**, v.41, p.278, 1982.

GUERREIRO, A.N.; MORAES, C.C.G.; MARINHO, A.N.R.; BARROS, B.C.V.; BEZERRA, D.A.M.; BANDEIRA, R.S.; SILVA, R.R.; ROCHA, D.C.C.; MENESES, A.M.C.; LUZ, M.A.; PAZ, G.S.; MASCARENHAS, J.D.P. Investigation of enteric viruses in the feces of neotropical migratory birds captured on the coast of the State of Pará, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.20, n.1, p.161-168, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2017-0589>

HAYNES, J.S.; REYNOLDS, D.L.; FAGERLAND, J.A.; FIX, A.S. Morphogenesis

of enteric lesions induced by group D rotavirus in ringneck pheasant chicks (*Phasianus colchicus*). **Veterinary Pathology**, v.31, n.1, p.74-81, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098589403100110>

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Official ICVT 2021 taxonomy. 2021. Disponível em: <<https://ictv.global/taxonomy>> Acesso em: 12 outubro 2022.

ISLAM, M.S.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U.; SAIFUZZAMAN, A.B.M.; KOBAYASHI, N.; KAYESH, M.E.H., UDIN, M.S. MOLECULAR EPIDEMIOLOGIC STUDY ON ROTAVIRUS INFECTION IN HUMAN AND BIRDS IN ASSOCIATION WITH GASTROENTERITIS. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v.7, p.233-237, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjvm.v7i1.5066>

ITO, H.; MINAMOTO, N.; HIRAGA, S.; SUGIYAMA, M. Sequence analysis of the VP6 gene in group A turkey and chicken rotaviruses. **Virus Research**, v.47, p.79-83, 1997.

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, p.123-138, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00234-9)

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**, v.412, p.384-391, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.031>

JOHNE, R.; SCHILLING-LOEFFLER, K.; ULRICH, R.G.; TAUSCH, S.H. Whole genome sequence analysis of a prototype strain of the novel putative rotavirus species L. **Viruses**, v.14, n.3, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14030462>

JOHNE, R.; TAUSCH, S.H.; GRÜTZKE, J.; FALKENHAGEN, A.; PATZINA-MEHLING, C.; BEER, M.; HÖPER, D.; ULRICH, R.G. Distantly Related Rotaviruses in Common Shrews, Germany, 2004–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v.25, n.12, p.2310-

2314, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2512.191225>

JONES, R.C.; HUGHES, C.S.; HENRY, R.R. Rotavirus infection in commercial laying hens. **The Veterinary Record**, v.104, n.1, p.22, 1979. DOI: [10.1136/vr.104.1.22-a](https://doi.org/10.1136/vr.104.1.22-a)

KANG, S.Y.; NAGARAJA, K.V.; NEWMAN, J.A. Primary Isolation and Identification of Avian Rotaviruses from Turkeys Exhibiting Signs of Clinical Enteritis in a Continuous MA 104 Cell Line. **Avian Diseases**, v.30, n.3, p.494-499, 1986.

KANG, K.I.; EL-GAZZAR, M.; SELLERS, H.S.; DOREA, F.; WILLIAMS, S.M.; KIM, T.; COLLETT, S.; MUNDT, E. Investigation into the aetiology of runting and stunting syndrome in chickens. **Avian Pathology**, v.41, p.41-50, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.632402>.

KARIM, M.R.; RUME, F.I.; ALAM, M.M.; AHMED, M.U. Molecular epidemiologic study on avian rotavirus prevailing in Bangladesh. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v.5, p.43-48, 2007. DOI: <https://doi.org/10.3329/bjvm.v5i1.1308>

KATTOOR, J.J.; MALIK, Y.S.; SHARMA, K.; KUMAR, N.; BATRA, M.; JINDAL, N.; YADAV, A.S. Molecular evidence of group D rotavirus in commercial broiler chicks in India. **Avian Biology Research**, v.6, p.313-316, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3184/175815513X13833072000>

KIEPPER, B.H.; MERKA, W.C.; FLETCHER, D.L. Proximate composition of poultry processing wastewater particulate matter from broiler slaughter plants. **Poultry Science**, v.87, n.8, p.1633-1636, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00331>

KINDLER, E.; TROJNAR, E.; HECKEL, G.; OTTO, P.H.; JOHNE, R. Analysis of rotavirus species diversity and evolution including the newly determined full-length genome sequences of rotavirus F and G. **Infection, Genetics and Evolution**, v.14, p.58-67, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.11.015>

KOOL, D.A.; HOLMES, I.H. The avian rotavirus Ty-1 Vp7 nucleotide and deduced amino acid sequences differ significantly from those of Ch-2 rotavirus. **Archives of**

Virology, v.129, p.227-234, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01316897>

KOUWENHOVEN, B.; DAVELAAR, F.G.; WALSUM, J.V. Infectious proventriculitis causing runting in broilers. **Avian Pathology**, v.7, n.1, p.183-187, 1978a. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457808418269>

KOUWENHOVEN, B.; VERTOMMEM, M.; VAN ECK, J.H.H. Runting and leg weakness in broilers: involvement of infectious factors. **Veterinary Science Communications**, v.2, p.253-259, 1978b. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02291456>

MALIK, Y.S.; BHAT, S.; DAR, P.S.; SIRCAR, S.; DHAMA, K.; SINGH, R.J. Evolving Rotaviruses, interspecies transmission and zoonoses. **The Open Virology Journal**, v.14, p.1-6, 2020. <https://doi.org/10.2174/1874357902014010001>

MASCARENHAS, J.D.P.; BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; SILVA, M.J.M.; SOUZA, E.C.J.; SOARES, L. Detection of the VP6 gene of group F and G rotaviruses in broiler chicken fecal samples from the Amazon region of Brazil. **Archives of Virology**, v.161, p.2263-2268, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2882-z>

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; MCCRACKEN, R.M. Experimental infection of chickens with rotaviruses: Clinical and virological findings. **Avian Pathology**, v.12, p.45-54, 1983. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079458308436148>

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; MCFERRAN, J.B. Isolation and Cell Culture Propagation of Rotaviruses From Turkeys and Chickens. **Archives of Virology**, v.61, p.13-21, 1979.

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; MCFERRAN, J.B.; MCCRACKEN, R.M. Isolation from Chickens of a Rotavirus Lacking the Rotavirus Group Antigen. **Journal of General Virology**, v.55, p.405-413, 1981. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-55-2-405>

MCNULTY, M.S.; TODD, D.; ALLAN, G.M.; MCFERRAN, J.B.; GREENE, J.A. Epidemiology of Rotavirus infection in Broiler Chickens: Recognition of Four Serogroups. **Archives of Virology**, v. 81, p. 113-121, 1984.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PATTON J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotavirus using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, p.1621-1629, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S.M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, v.156, n.8, p.1397-1413, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U.; RANST M.V.; JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v. 157, p. 1177-1182, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3>

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; TODD, D.; MCFERRAN, J.B. Isolation and cell culture propagation of rotaviruses from turkeys and chickens. **Archives of Virology**, v.61, n.1-2, p.13-21, 1979a. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01320587>

MCNULTY, M.S.; CURRAN, W.L.; TODD, D.; MCFERRAN, J.B. Detection of viruses in avian faeces by direct electron microscopy. **Avian Pathology**, v.8, n.3, p.239-247, 1979b. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457908418349>

MCNULTY, M.S.; TODD, D.; ALLAN, G.M.; MCFERRAN, J.B.; GREENE, J.A. Epidemiology of rotavirus infection in broiler chickens: recognition of four serogroups. **Archives of Virology**, v.81, n.1-2, p.113-121, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01309301>

MEKONNEN, M.M.; HOEKSTRA, A.Y. A global assessment of the water footprint of farm animal products, **Ecosystems**, v.15, n.3, p.401-405, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10021-011-9517-8>

METTIFOGO, E.; NUÑEZ, L.F.; CHACÓN, J.L.; SANTANDER, P.S.H.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; JEREZ, J.A.; JONES, R.C.; PIANTINO, A.J.F. Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health. **Scientific World Journal**, v.9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/450423>

MIHALOV-KOVÁCS, E.; GELLÉRT, Á.; MARTON, S. FARKAS, S.L.; FEHÉR, E.; MIKLÓS, O.; JAKAB, F.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, v.21, n.4, p.660-663, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2104.141370>

MINAMOTO, N.; YUKI, M.; SUGIYAMA, M.; KINJO, T.; TAKADA, J. Inactivation of several animal viruses by glutaraldehyde. **Journal of the Japan Veterinary Medical Association**, v.41, p.497-501, 1988. DOI: <https://doi.org/10.12935/jvma1951.41.497>

MORI, Y.; SUGIYAMA, M.; TAKAYAMA, M.; ATOJI, Y.; MASEGI, T.; MINAMOTO, N. Avian-to-Mammal Transmission of an Avian Rotavirus: Analysis of Its Pathogenicity in a Heterologous Mouse Model. **Virology**, v.288, n.1, p.63-70, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1051>

MORI, Y.; BORGAN, M.A.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4s derived from Group A avian rotaviruses. **Virus Research**, v.89, p.145-151, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(02\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(02)00112-0)

MORI, Y.; BORGAN, M.A.; TAKAYAMA, M.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Roles of outer capsid proteins as determinants of pathogenicity and host range restriction of avian rotaviruses in a suckling mouse model. **Virology**, v.316, p.126-234, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.08.006>

MOURA-ALVAREZ, J.; CHACON, J.V.; SCANAVINI, L.S.; NUÑEZ, L.F.N.; ASTOLFI-

FERREIRA, C.S.; JONES, R.C.; FERREIRA, A.J.P. Enteric viruses in Brazilian turkey flocks: Single and multiple virus infection frequency according to age and clinical signs of intestinal disease. **Poultry Science**, v.92, p.945-955, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02849>

NEWELL D.G.; FEARNLEY, C. Sources of Campylobacter colonization in broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.8, p. 4343-4351, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4343-4351.2003>

NISHIKAWA, K.; HOSHINO, Y.; GORZIGLIA, M. Sequence of the VP7 gene of chicken rotavirus Ch2 strain of serotype 7 rotavirus. **Virology**, v.185, n.2, p.853-856, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90558-s](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90558-s)

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**, v.9, n.1, p.72-76, 2010. DOI: <https://doi.org/10.3923/ijps.2010.72.76>

OGDEN, K.M.; JOHNE, R.; PATTON, J.T. Rotavirus RNA polymerases resolve into two phylogenetically distinct classes that differ in their mechanism of template recognition. **Virology**, v.431, p.50-57, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2012.05.011>

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, p. 8-15, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.001>

OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M.; REETZ, J.; LÖHREN, U.; DILLER, R. Detection of Rotaviruses and Intestinal Lesions in Broiler Chicks from Flocks with Runting and Stunting Syndrome (RSS). **Avian Diseases**, v.50, p.411-418, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/7511-020106R.1>

PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.J.; DAY, M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. **Avian Diseases**, v.51, n.3, p.674-680, 2007. DOI: [https://doi.org/10.1637/1933-5334\(2007\)2\[e4:PMOCTF\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/1933-5334(2007)2[e4:PMOCTF]2.0.CO;2)

PATTON, J.T.; VASQUEZ-DEL CARPIO, R.; TOTORICI, M.A.; TARAPOREWALA, Z.F. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. **Advances in Virus Research**, v.69, p.167-201, 2006. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)69004-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)69004-0)

PATZINA-MEHLING, C.; FALKENHAGEN, A.; GADICHERLA, A.K.; GRÜTZKE, J.; TAUSCH, S.H.; JOHNE, R. Whole genome sequence analysis of cell culture-adapted rotavirus A strains from chicken. **Infection, Genetics and evolution**, v.81, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104275>

PAULY, M.; ONI, O.O.; SAUSY, A.; OWOADE, A.A.; ADEYEFA, C.A.O.; MULLER, C.P.; HÜBSCHEN, J.M.; SNOECK, C.J. Molecular epidemiology of Avian Rotaviruses Group A and D shed by different bird species in Nigeria. **Virology Journal**, v.14, 111, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0778-5>

PEDLEY, S.; BRIDGER, J.C.; CHASEY, D.; MCRAE, M.A. Definition of two new groups of atypical rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.67, n.1, p.131-137, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-1-131>

PHAN, T.G.; VO, N.P.; BOROS, A.; PANKOVICS, P.; REUTER, G.; LI, O.T.W.; WANG, C.; DENG, X.; POON, L.L.M.; DELWART, E. The viruses of wild pigeon droppings. **PLoS ONE**, v.8, n.9, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072787>

PINHEIRO, M.S.; DIAS, J.B.; CUNHA, B.R.A.V.; PETRUCCI, M.P.; TRAVASSOS, C.E.P.F.; MENDES, G.S.; SANTOS, N. Rotavirus F and G circulating in chickens in Southeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.54, n.113, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03113-x>

QAMAR, M.F.; ASLAM, H.; JAHAN, N. Histopathological Studies on Stunting Syndrome in Broilers, Lahore, Pakistan. **Veterinary Medicine International**, v. 2013, p.1-6, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/212830>

RAVIDRAN, V.; ABDOLLAHI, M.R. Nutrition and digestive physiology of the broiler chick: State of the art and outlook. **Animals**, v.11, p. 1-23, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11102795>

REBEL, J.M.J; BALK, F.R.M.; POST, J.; VAN HEMERT, S.; ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE, N. Malabsorption syndrome in broilers. **World 's Poultry Science Journal**, v.62, p.17-30, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1079/WPS200481>

RCWG - ROTAVIRUS CLASSIFICATION WORKING GROUP. **Newly assigned genotypes - July 2th 2021.** 2021. Disponível em: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/newgenotypes>
Acesso em: 10 nov. 2022.

ROHWEDDER, A.; IRMAK, H.; WERCHAU, H.; BRÜSSOW, H. Nucleotide Sequence of Gene 6 of Avian-like Group A Rotavirus 993/83. **Virology**, v.195, p.820-825, 1993.

ROHWEDDER, A.; SCHÜTZ, K.I.; MINAMOTO, N.; BRÜSSOW, H. Sequence analysis of pigeon, turkey, and chicken rotavirus VP8* identifies Rotavirus 993/83, isolated from calf feces, as a pigeon rotavirus. **Virology**, v.210, p.231-235, 1995.

ROHWEDDER, A.; HOTOP, H.; MINAMOTO, N.; ITO, H.; NAKAGOMI, O.; BRÜSSOW, H. Bovine rotavirus 993/83 shows a third subtype of avian VP7 protein. **Virus Genes**, v.14, n.2, p.147-151, 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 Journal of Biotechnology**, v.7, p.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,

p.334-343, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.040>

SCUARCIALUPI, L.N.; BESERRA, L.A.R.; HOCHHEIM, J.R.; SOARES, R.M.; GREGORI, F. Genetic Characterization of Avian Rotavirus Groups F and G in Brazilian Farms. **Hosts and Viruses**, v.5, n.2, p.12-16, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.hv/2018/5.2.12.1>

SILVA, R.R.; BEZERRA, D.A.M.; KAIANO, J.H.L.; MANNO, M.C.; OLIVEIRA, D.S.; SAGICA, F.E.S.; GABBAY, Y.B.; CHAVES, S.O.C.; SILVA, A.L.C.; ALFIERI, A.A.; MASCARENHAS, J.D.P. Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples of broiler chickens in Amazon Region, Brazil, from August 2008 to May 2011. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.4, n.2, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232013000200007>

SILVA, L.C.; SANCHES, A.A.; GREGORI, F.; BRANDÃO, 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**, v.93, n.2, p.1066-1069, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.12.007>

SONGSEEM, T.H.; POL, J.M.A.; VAN ROOZELAAR, D.; KOK, G.L.; WAGENAAR, F.; TER HUURNE A.A.H.M. A Comparative Study of the Pathogenesis of Malabsorption Syndrome in Broiler. **Avian Diseases**, v.44, p.556-567, 2000. DOI: <https://doi.org/10.2307/1593095>

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 wild bird in Japan. **Veterinary Medicine and Science**, v.53, p.479–486, 1991.

TAMEHIRO, C.Y.; ALFIERI, A.F.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.A. Segmented double stranded genomic RNA viruses in fecal samples from broiler chicken. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.4, p.344-348, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000400013>

THEIL, K.W.; REYNOLDS, D.L.; SAIF Y.M.; Genomic variation among avian rotavirus-like viruses detected by polyacrylamide gel electrophoresis. **Avian Diseases**, v.30, n.4, p.829-834, 1986. DOI: <https://doi.org/10.2307/1590594>

THEIL, K.W.; SAIF, Y.M. Age-related infections with rotavirus, rotavirus like virus, and atypical Rotavirus in turkey Flocks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.2, p.333-337, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.25.2.333-337.1987>.

TODD, D.; MCNULTY, M.S. Electrophoretic variation of avian rotavirus RNA in polyacrylamide gels. **Avian Pathology**, v.15, p.149-159, 1986.

TROJNAR, E.; OTTO, P.; JOHNE, R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Virology**, v.386, p.325-333, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.034>

TROJNAR, E.; OTTO, P.; ROTH, B.; REETZ, J.; JOHNE, R. The Genome Segments of a Group D Rotavirus Possess Group A-Like Conserved Termini but Encode Group-Specific Proteins. **Journal of Virology**, v.84, p.10254-10265, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00332-10>

TROJNAR, E.; SACHSENROEDER, J.; TWARDZIOK, S.; REETZ, J.; OTTO, P.H.; JOHNE, R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.94, n.1, p.136-142, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.047381-0>

URSU, K.; KISFALI, P.; RIGÓ, D.; IVANICS, E.; ERDÉLYI, K.; DAN, A.; MELEGH, B.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1365-1369, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0439-0>

VAN DER HEIDE, L.; LÜTTICKEN, D.; HORZINEK, M. Isolation of avian reovirus as a possible etiologic agent of osteoporosis ("brittle bone disease"; "femoral head necrosis") in broiler chickens. **Avian Diseases**, v.25, n.4, p.847-865, 1981.

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**, v.8, n.3, p.187-191, 2006.

WANG, J.H.; KOO, B.S.; MO, I.P.; KANG, S.Y. Molecular characterization of avian rotavirus isolated in Korea. **Korean Journal of Veterinary Service**, v.36, n.1, p.23-30, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.7853/kjvs.2013.36.1.23>

WANI, S.A.; BHAT, M.A.; ISHAQ, S.M.; ASHRAFI, M.A.; BUCHH, A.S.; HAQ, M. Detection of a mammalian-like group A rotavirus in diarrhoeic chicken. **Veterinary Microbiology**, v.94, p.13-18, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(03\)00079-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(03)00079-8)

WOOD-GUSH, D.G.M. The behaviour of the domestic chicken: a review of the literature. **The British Journal of Animal Behaviour**, v.3, p.81-110, 1955. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0950-5601\(55\)80001-9](https://doi.org/10.1016/S0950-5601(55)80001-9).

WU, G.; BAZER, F.W.; CROSS, H.R. Land-based production of animal protein: impacts, efficiency, and sustainability. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n.1328, p.18-28, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/nyas.12566>

YADUVANSHI, S.; SINGH, R.; BHATTACHARYA, A.; MOHMMED, I.; SIRCAR, S.; MALIK, Y.S. Detection, prevalence and molecular characterization of avian rotavirus. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.92, p.701-705, 2022.

YASON, C.V.; SCHAT, K.A. Isolation and characterization of avian rotaviruses. **Avian Diseases**, v.29, p.499-508, 1985

YASON, C.V.; SCHAT, K.A. Experimental infection of specific-pathogen-free chickens with avian rotaviruses. **Avian Diseases**, v.30, p.551-556, 1986a.

YASON, C.V.; SCHAT, K.A. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups

of chickens and turkeys: Clinical signs and virology. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, p.977-983, 1987.

YASON, C.V.; SCHAT, K.A. Pathogenesis of rotavirus infection in turkey poults **Avian Pathology**, v.15, p.421-435, 1986b.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Caracterizar as espécies de rotavírus (RV) aviário e genótipos de cepas virais de uma coleção de amostras de excretas positivas para RV, de pintainhos de frangos de corte do manejo de descarte com sinais clínicos de diarreia e síndrome de má absorção coletadas no estado do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a presença de RV espécies A, D, F e G, por meio de amplificação parcial do gene VP6.
- Determinar os genótipos I (gene VP6) de RV aviário, espécies A, D e F.
- Determinar o genótipo G (gene VP7) de RV aviário espécies A e D.

4 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

4.1 PARTIAL SEQUENCE ANALYSIS OF THE VP6 GENE OF ROTAVIRUS SPECIES A, D, AND F IN FIELD STRAINS IDENTIFIED IN DIARRHEIC BROILER CHICKENS

ABSTRACT

Rotavirus (RV) is one of the most important causes of viral enteric disease in many livestock animal species. RV is a non-enveloped icosahedral particle, and its genome comprises 11 segments of double-stranded RNA which encodes six structural proteins (VP) and five to six nonstructural proteins (NSP). The most abundant VP is the VP6 of the intermediate capsid which defines the RV species. The avian RV is classified into four distinct species denominated RVA, RVD, RVF, and RVG. Like mammalian RV, the RVA is the most reported species in avian hosts, but compared to mammalian RV, studies for the molecular characterization of avian RV are still few in Brazil and worldwide. RVD, RVF, and RVG so far have only been identified in avian species. This study aimed to determine the RV species and to perform molecular studies on the VP6 gene in a collection of fecal samples previously identified as positive for RV by the silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis technique. The 55 individual fecal samples were obtained from broiler chickens aged between 1-2 weeks old with diarrhea and clinical signs of malabsorption syndrome. For the determination of RV species, the nucleic acid of fecal samples was submitted to RT-PCR assay for partial amplification of the VP6 gene of RV species A, D, F, and G. The amplified products of all RT-PCR assays were sequenced and the nucleotide (nt) sequences submitted to phylogenetic analysis. RVA, RVD, and RVF species were identified in 10, 17, and 28 fecal samples, respectively. In addition, only one species of RV was identified in each individual sample. The RVG VP6 gene was not amplified in any of the analyzed samples. Phylogenetic analysis showed that the 10 RVA strains clustered in genotype I11, and the RVD and RVF strains showed 89% and 93 to 98% nt identity, respectively, compared with other avian RV strains from Brazil and worldwide. The molecular characterization of circulating RV strains in avian species makes it possible to determine the molecular epidemiology of infections. Monitoring circulating viral strains in commercial and wild avian species allows us to evaluate aspects related to viral evolution, genetic reassortment, and RV interspecies transmission to evaluate methods of control and prophylaxis of infections.

Keywords: Avian rotavirus; poultry; diarrhea; genotype I.

INTRODUCTION

Worldwide rotavirus (RV) infection is the main viral etiology of diarrhea in young animals, including mammals and avian species (Malik *et al.*, 2020). In addition to children, the infection of mammals has clinical and epidemiological importance in several species of livestock animals, especially calves and piglets (Caddy *et al.*, 2021). Based on the viral protein VP6 present in the middle layer of capsid, to date, nine (A to D, F to J) RV species have been described (ICTV, 2021).

Avian RV is a relevant cause of enteric infection in avian species that results in diarrhea and dehydration (Dhama *et al.*, 2015). In broiler chickens, among other enteropathogens, RV infection is related to the occurrence of a set of clinical signs generically known as malabsorption syndrome or runting stunting syndrome. This syndrome determines the reduction in weight gain, non-uniformity of the batches, and high culling rates (Otto *et al.*, 2006).

In Brazil, the occurrence of avian RV was previously evaluated in broilers, layers, and broiler breeders with (Alfieri *et al.*, 1989; Mettifogo *et al.*, 2014; Gallego *et al.*, 2022) and without clinical signs (Beserra; Gregori, 2014; Beserra *et al.*, 2014; Bezerra *et al.*, 2014; Mascarenhas *et al.*, 2016; Beserra *et al.*, 2020; Pinheiro *et al.*, 2022).

In avian, four RV species (RVA, RVD, RVF, and RVG) have already been identified (Dhama *et al.*, 2015). RVA infection occurs in mammals and avian species, while the RV D, F, and G species occur exclusively in avian hosts (Malik *et al.*, 2020). Due to the small number of nucleotide (nt) sequences of the VP6 gene from RVD, RVF, and RVG available in public databases (GenBank), the classification into genotypes (I) for these RV species has not yet been performed (Alárcon *et al.*, 2022), however, for avian RVA strains is possible to perform the genotype I determination. Phylogenetic analysis performed on the VP6 gene defines genotype I in avian RVA field strains, unlike the RV strains identified in mammals, there are few studies on the molecular characterization of avian RV strains (Alárcon *et al.*, 2022).

The first VP6 genotype identified in an avian RVA strain was the I4 genotype in studies conducted in Japan and in the United Kingdom and later in Germany and Nigeria (Pauly *et al.*, 2017; Schumann *et al.*, 2009). Afterward, the I11 genotype was

described in Ireland, Germany, and Nigeria (Patzina-Mehling *et al.*, 2020; Schumann *et al.*, 2009; Trojnar *et al.*, 2009; Otto *et al.*, 2006). Recently, the I21 genotype was described from wild Japanese common gull fecal samples (Fuji *et al.*, 2022b). A previous study conducted in Brazil with fecal samples from commercial chicken reported the identification of I11 and I4 genotypes in RVA field strains (Beserra *et al.*, 2020).

This study aimed to determine the RV species by RT-PCR assays and to perform partial sequence analysis of the VP6 gene in avian RV field strains that belong to a collection fecal samples previously identified as RV positives using silver-stained polyacrylamide gel electrophoresis technique.

MATERIALS AND METHODS

Ethics approval

The experimental procedure agrees with the ethical principles compiled by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Animals Use Ethics Committee (CEUA/protocol number 15/2014) of the Universidade Federal do Parana.

Biological samples

The 55 intestinal contents from small-sized broiler chicks (runts) were previously identified as RV-positives by silver-stained - polyacrylamide gel electrophoresis (Gallego *et al.*, 2022). The positive samples were obtained in 2015 from individual broiler chickens of *COBB 500* commercial strain, aged between one to two weeks old with diarrhea and clinical signs of malabsorption syndrome. All samples are from ten poultry flocks on Paraná State, southern Brazil and belong to a collection maintained at the Universidade Federal do Parana, in the Animal Virology Laboratory, and were kept stored at -80 °C until processing.

Nucleic acid extraction

For RV detection, the fecal samples were eluted (10% w/v) in Tris/Calcium buffer (10 mM Tris-HCl; 1.5 mM CaCl₂; pH 7.3) and centrifuged at 5,000 x g for 10 min. Aliquots of 500 µL of supernatant were treated with sodium dodecyl sulfate (1% final concentration) and incubated for 30 min at 56°C. A combination of the

phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidine isothiocyanate methods (Alfieri *et al.*, 2006) was used for nucleic acid extraction. The nucleic acid was eluted in 50 μ L of ultrapure sterile water treated with diethylpyrocarbonate (DPEC) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). DPEC water was used as negative control and positive samples for each avian RV species were included as positive controls.

RT-PCR assay

To confirm the presence of avian RV species and to detect possible RV co-infections the extracted nucleic acids were submitted to singleplex RT-PCR assays with specific primers for partial amplification of the VP6 gene of avian RVA (Schumann *et al.*, 2009), RVD (Bezerra *et al.*, 2012), RVF, and RVG (Mascarenhas *et al.*, 2016). Information about the specific primers used in this study are listed in Table 1.

Sequencing and phylogenetic analysis

The RT-PCR amplicons were purified using the PureLink[®] Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and quantified in a Qubit[™] fluorometer using Quant-iT[™] dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA). The sequencing reactions were performed in both directions with the same forward and reverse primers used in RT-PCR assays in an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer with BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The nt sequence quality analysis was performed using PHRED software and the consensus sequences were assembled using the CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). The nt sequence similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) software. Additionally, nt sequences were submitted to the Virus Pathogen Database and Analysis Resource (<http://www.viprbrc.org/>) automated genotyping tool to confirm the avian RVA genotypes (Pickett *et al.*, 2012). The nt sequences were aligned with representative strains from other RV species retrieved from GenBank with ClustalW (Thompson *et al.*, 1994). Phylogenetic tree based on 390 nt sequences was obtained using the maximum composite likelihood (ML) method with Tamura-3-parameter plus Gamma distribution (T92+G) model with 1,000 bootstrap replicates using the MEGA software

package (Version 6.0) (Tamura *et al.*, 2013). The nt substitution model was determined according to the find best model analysis implemented in MEGA software. The RVA, RVD, and RVF sequences were generated identity matrices with 729, 729 and 780 nt respectively, using BioEdit software version 7.2 (Hall, 1999).

RESULTS

Out of 55 individual fecal samples evaluated by RT-PCR assay in 10, 17, and 28 was possible to confirm the presence of avian RVA, RVD, and RVF species, respectively. The VP6 gene of the RVG species was not detected in any sample analyzed. In this study, it was not possible to simultaneously identify RNA from more than one RV species in any individual sample.

The nt analyses of the 10 RT-PCR sequences with 729 nt, between 349 to 1078 nt (reference strain 06V0661, GenBank accession number: EU486969) of VP6 gene of avian RVA positive field samples showed 90 to 92% and 96% of nt and aa identity in comparison to the reference strain 96 to 100% of nt and 100% aa identities to each other, furthermore the nt identity with other Brazilian strains ranged 94 to 97%. The RVA strains revealed nine substitutions when compared with the reference strain (12 Y→N; 24 D→N; 25 M→L; 65 C→W; 67 T→N; 84 D→N; 86 H→Q; 98 V→L; 142 K→N), showed six distinct aa divergence with one Brazilian strain collect year 2008 (122 I→V; 134 D→E; 156 V→N; 168 N→K; 169 F→K; 200 N→T), and neither aa divergence was shown compared with worldwide samples (Table 2). Based on sequence and phylogenetic analysis all avian RVA strains described in this study belongs to I11 genotype (Figure 1).

Twelve out of 17 RVD positive samples in RT-PCR assay were successfully sequenced obtaining fragments of 729 nt, corresponding to nt position 25 to 754 of VP6 gene (reference strain 06V0047, GenBank accession number: JN034679). The nt sequences presented 89% of the nt and 98% of the aa identity and three aa substitutions when compared to the RVD reference strain, and 98 to 100% and 99 to 100% of nt and aa identity to each other. The RVD sequences from this study clustered together in the phylogenetic tree forming a separated branch (subcluster) to the RVD strains already described (Figure 1). The RVD strains revealed mild-degree similarity with prototype 06V0047 strain with three aa substitutions (15 I→V; 97 V→I; and 234 E→D). The RVD strains previously described from Brazil revealed 89% nt identity and

one aa divergence when compared with the KC623164 sequence strain (16 K→R). When compared the RVD sequences from this study with the RVD sequences from other countries such as India, Netherlands, and Bangladesh showed 89% of nt identity. Furthermore, showed three distinct aa divergence with Bangladesh strains (12 I→A; 14 A→T; 106 I→V) and two compared with India strain (153 T→M; 232 M→I) (Table 3).

About the RVF positive samples in RT-PCR assay, 11 sequences with 780 nt were obtained, which corresponds to nt position 90 to 870 compared to the prototype RVF 03V0568 (GenBank accession number: NC021635). Comparing to RVF prototype strain the RVF Brazilian strains showed 87% and 95% of the nt and aa identity, respectively, and 12 aa substitutions (38 I→V; 59 I→V; 68 T→A; 118 T→M; 129 T→A; 172 I→V; 179 A→P; 183 N→D; 234 G→D; 245 V→I; 258 V→A; and 296 I→V) (Table 4). The VP6FPR_63 strain showed one more aa substitution at position 33 (S→F). The Brazilian RVF field strains described in this study, exhibited 97 to 100% and 99 to 100% of nt and aa identity to each other, respectively. In the phylogenetic tree the RVF strains clustered with one Italian and three Brazilian RVF strains previously described (Figure 1).

The partial VP6 nt sequences of the avian RVA, RVD, and RVF strains described in this study are available in GenBank about the accession numbers: xxx to xxx, xxx to xxx, and xxx to xxx, respectively.

DISCUSSION

In the present study, the use of species-specific primers for partial amplification of the VP6 gene enabled to determine that 18% (10/55), 30.9% (17/55), and 50.9% (28/55) of the samples analyzed were positive for RVA, RVD, and RVF, respectively. The occurrence of RVA species in avian samples using RT-PCR assay in different countries has demonstrated a positivity rate of 36 to 44% (Pauly *et al.*, 2017; Falcone *et al.*, 2015; Otto *et al.*, 2012). The Brazilian surveillance showed a 9% to 53.8% positivity rate using RT-PCR assay with VP6 (Beserra *et al.*, 2020; Mettifogo *et al.*, 2014), VP7 (Beserra *et al.*, 2014; or NSP4 for target gene (Silva *et al.*, 2013).

The RVD species occurrence is higher than avian RVA reports, with 4.5 to 36.4% from India and Nigeria poultry farms (Pauly *et al.*, 2017; Kattoor *et al.*, 2013). From Europa, the RVD species was detected in 50 to 66% of the samples analyzed by

RT-PCR assay (Falcone *et al.*, 2015; Otto *et al.*, 2012). In Brazil, the rate of RVD-positive samples ranged from 35 to 53% (Bezerra *et al.*, 2014; Bezerra *et al.*, 2012).

RVF and RVG species have lower detection rates even with sensitivity assays such as RT-PCR. The RVF positivity rates from Brazilian poultry farms ranged from 5.6 to 10.7% (Pinheiro *et al.*, 2022; Scuarcialupi *et al.*, 2018; Mascarenhas *et al.*, 2016; Bezerra *et al.*, 2014). So far, the RVF highest detection rate was 52% by RT-PCR assay from Italian poultry flocks (Falcone *et al.*, 2015). Unlike the lower detection rates related with RVF species, in this study the RVF had a high detection rate compared with the RVD and RVA positivity rates.

About the avian RV co-infection (dual or multiple), in this study none sample exhibited co-infection with any avian RV species. Differently, 38 to 45% of double or multiple avian RV infections were detected in Italian and other European poultry farms (Falcone *et al.*, 2015; Otto *et al.*, 2012), and double avian RV species infections have already been described on commercial poultry farms from Brasil, Nigeria, European and Bangladesh. (Pauly *et al.*, 2017; Scuarcialupi *et al.*, 2018; Beserra and Gregori, 2014; Otto *et al.*, 2012). This may be related to the form of collection (individual), age range, disease status of broilers sampled, high viral excretion at the time of sampling from one RV species and would be with low viral load from another RV species (Gallego *et al.*, 2022). The Italian co-infection study analyzed intestinal content pooled samples with 5 to 10 birds showing clinical signs of enteric disease, with one to six weeks of age (Falcone *et al.*, 2015). Above the European co-infections rates are from chicken and turkey with RSS or diarrhea clinical signs, this sampling data had a large range of age, like two days to two months old, furthermore the RNA extraction analyses by individual samples or pool were not clarified (Otto *et al.*, 2012). For this study, all samples were 1-2 weeks old, and were analyzed individually.

In this study, the partial sequence analysis of the VP6 gene of Brazilian avian RVA field strains presented a low degree of genetic variability in comparison with the 06V0661 prototype strain (Schumann *et al.*, 2009) and also with other avian RVA sequences from Brazil, showing 94 to 97% of nt identity and six aa divergences with just one strain (GenBank accession number: KX198692) (Beserra *et al.*, 2014). Compared with other avian RVA strains described from Germany, Korea, and Nigeria that belong to the I11 genotype showed 92 to 94% of nt identity (Pauly *et al.*, 2017; Koo *et al.*, 2013; Schumann *et al.*, 2009). Compared with the I4 genotype cluster our VP6 sequences had just 75 to 78% of nt identity and 74% when compared with the I21

genotype from a common gull wild sample (Fujii *et al.*, 2022b; Beserra *et al.*, 2020; Pauly *et al.*, 2017; Rohwedder *et al.*, 1993).

The phylogenetic analysis confirmed the information above with distinct clades for each VP6 genotype of avian RVA, supported by high bootstrap values. Besides our RVA strains grouping inside, and nearby other RV strains described in previous studies from Brazil. The VP6 partial phylogenetic analysis demonstrates that the avian RVA strains from this study clustered with other I11 genotype strains previously described in Brazil and other countries, such as Germany, Korea, and Nigeria. Furthermore, six and nine aa divergences was presented when compared with I11 genotype strains from Brazil and with the reference strain, respectively (Beserra *et al.*, 2020; Pauly *et al.*, 2017; Koo *et al.*, 2013; Schumann *et al.*, 2009).

Two genotypes (I4 and I11) have been reported of avian RVA strains identified in chick and turkey poults from Germany and Brazil (Beserra *et al.*, 2020; Schumann *et al.*, 2009; Trojnar *et al.*, 2009; Rohwedder *et al.*, 1995;). Two genotypes are related to Japanese strains, I21 from a common gull and I4 from a pigeon (Fujii *et al.*, 2022a; Fujii *et al.*, 2022b). The histidine residue at position 153 is involved in zinc binding, is necessary to VP6 trimer structure and is conserved in all RVA isolates but not in the other RV species (Mathieu *et al.*, 2001). The His153 was conserved in all avian RVA Brazilian strains sequences analyzed from this study.

The RVD sequences showed three, one, and five aa divergences compared to the reference, Brazilian, and worldwide RVD strains, respectively. The nt identity remained at 89% to 90% compared with Brazilian, worldwide, and reference strain, due to this forming a separated branch (subcluster) to the other RVD strains already described (Bezerra *et al.*, 2014; Kattoor *et al.*, 2012).

The RVF analysis had a similarity with strains previously described in Brazil varied between 93 to 98% and with one aa divergence at VP6FPR_63 strain (33 S→F) (Scuarcialupi *et al.*, 2018; Mascarenhas *et al.*, 2016; Beserra; Gregori, 2014). This nt identity is lower (87%) when compared with the 03V0568 prototype strain which showed 13 aa substitutions, this prototype strain was collected at 2003 year (Johne *et al.*, 2011) but the Italian strain at the 2010 collection year didn't show any aa substitution compared with these RVF study samples (Falcone *et al.*, 2015).

About the VP6 gene from RVD and RVF, more query cover and available sequences are needed to advance knowledge about mutation rates for avian RV non-A. Although VP6 is the highest conserved protein of RV, the sequence data analysis

can elucidate and provide useful epidemiological aspects and knowledge about the avian RV infection in the commercial poultry broiler from the highest production areas.

Considering the widespread use of chickens for food production and the high incidence of RV infection in this animal species (Gallego *et al.*, 2022; Otto *et al.*, 2007; Rohwedder *et al.*, 1993), relatively high exposure of humans with avian RVs would be expected (Schumann *et al.*, 2009). Whereas mammalian RV is known to be transmitted to humans, so the role of avian RV is still unknown (Schumann *et al.*, 2009). The poultry farms where the biological samples were collected are in Parana State, southern Brazil (Gallego *et al.*, 2022). This region is a highly productive animal farm and is closer to wild ecosystems such as Iguazu National Park, Ilha Grande National Park, Mbaracayu Forest Nature Reserve, and Perobas Biological Reserve. Resembling the region described from studies of the state of Para, northern Brazil with urban, rural, and wild ecosystems (Duarte *et al.*, 2020; Mascarenhas *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2013).

Anyway, animal RV diversity may contribute to genetic variability by direct transmission or by reassortment events (Beserra *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2020). Furthermore, farm animals are an excellent model to study these complex interactions because of the large scale, the massive numbers of replicates, the controlled conditions of rearing, and the accumulated knowledge about physiology, diseases, nutrition, and behavior (Carrasco *et al.*, 2022). Still, highlights the distinct broiler production factors, such as short productive time and poultry litter reuse (Bolan *et al.*, 2010). In addition, physiological and behavioral factors such as constant excretion near feed, chicken scratch habit, and coprophagous activity enable the fecal-oral spread (Line, Hiett, and Conlan, 2008).

CONCLUSION

This study confirmed the infection by avian RVA, RVD, and RVF species in this geographical region, which is characterized by high production and, mainly, the productivity of chicken meat in Brazil. The VP6 sequence analysis of avian RV Brazilian field strains described in this study doesn't have high mutation rates when compared with other avian RV strains. However, there are few avian RV genome sequences available in the public databases (GenBank). Studies of molecular characterization of avian RV field strains may contribute to studies related to the classic and molecular epidemiology of avian RV infection, as well as the adoption of internal and external

biosecurity measures to reduce infection and, consequently, morbidity, culling, and mortality rates in young animals.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support: the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the Araucaria Foundation (FAP/PR), the Laboratory of Animal Virology from Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, and the Laboratory Animal Virology from Universidade Federal do Paraná.

References

- ALARCÓN, R.G.D.; LIOTTA, D.J.; MIÑO, S. Zoonotic RVA: State of the Art and Distribution in the Animal World. **Viruses**, v.14, p.2554, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14112554>
- ALFIERI, A.F.; RESENDE, M.; RESENDE, J.S.; ALFIERI, A.A. Atypical rotavirus infections among broiler chickens in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.41, p.81-82, 1989.
- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health Production**, v.38, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4349-9>
- BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, B.R.P; BERNARDES, N.T.C.G.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F. Occurrence and Characterization of Rotavirus A in Broilers, Layers, and Broiler Breeders from Brazilian Poultry Farms. **Avian diseases**, v.58, p.153-154, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/10626-080513-ResNote.1>
- BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, C.M.; BERG, M.; BRANDÃO, P.E.; SOARES, R.M.; GREGORI, F. Genome constellations of rotavirus a isolated from avian species in Brazil, 2008–2015. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.51, p.1363-1375, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00259-4>
- BESERRA, L.A.R; GREGORI, F. Description of rotavirus F in broilers from Brazilian poultry farms. **Avian Diseases**, v.58, p. 458-461, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1637/10747-121613-ResNote.1>
- BOLAN, N.S.; SZOGI, A.A.; CHUASAVATHI, T.; SESHADRI, B.; ROTHROCK JR, M.J.; PANNEERSELVAM, P. Uses and management of poultry litter. **World's Poultry**

Science Journal, v.66, p.673-698, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0043933910000656>

BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; KAIANO, J.H.L.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P. Detection, epidemiology and characterization of VP6 and VP7 genes of group D rotavirus in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.43, n.3, p.238-243, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2014.913097>

BEZERRA, D.A.M.; 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. **Journal of Virological Methods**, v.185, n.2, p.189-192, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.017>

CADDY, S.; PAPA, G.; BORODAVKA, A.; DESSELBERGER, U. Rotavirus research: 2014-2020. **Virus Research**, v.304, p.1-21, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198499>

CARRASCO, J.M.D.; REDONDO, L.M.; CASANOVA, N.A.; MIYAKAWA, M.E.F. The role of farm environment and management in shaping the gut microbiota of poultry. In: KOGUT, M.H.; ZHANG, G. (Eds.) Gut microbiota, immunity, and health in Production animals. **The Microbiomes of Humans, Animals, Plants, and the Environment**, v.4, 2022. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-90303-9_10

DHAMA, K.; SAMINATHAN, M.; KARTHIK, K.; TIWARI, R.; SHABBIR, M.Z.; KUMAR, N.; MALIK, Y.S.; SINGH, R.K. Avian rotavirus enteritis - an updated review. **Veterinary Quarterly**, v.35, n.3, p.142-158, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01652176.2015.1046014>

DUARTE JÚNIOR, J.W.B.; CHAGAS, E.H.N.; SERRA, A.C.S.; SOUTO, L.C.S.; PENHA JÚNIOR, E.T.; BANDEIRA, R.S.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; OLIVEIRA, H.G.S.; SOUSA, T.K.S.; LOPES, C.T.A.; DOMINGUES, S.F.S.; PINHEIRO, H.H.C.; MALIK, Y.S.; SALVARANI, F.M.; MASCARENHAS, J.D.P. Occurrence of rotavirus and picobirnavirus in wild and exotic avian from amazon forest. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.15, n.9, p.1-18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008792>

FALCONE, E.; BUSI, C.; LAVAZZA, A.; MONINI, M.; BERTOLETTI, M.; CANELLI, E.; VIGNOLO, E.; RUGGERI, F.M.; BONIOTTI, M.B. Molecular characterization of avian rotaviruses circulating in Italian poultry flocks. **Avian Pathology**, v.44, p.509-515, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2015.1096011>

FUJII, Y.; HIRAYAMA, M.; NISHIYAMA, S.; TAKAHASHI, T.; OKAJIMA, M.; IZUMI, F.; TAKEHARA, K.; MASATANI, T.; SUGIYAMA, M.; ITO, N. Characterization of an avian rotavirus A strain isolated from A velvet scoter (*Melanitta fusca*): implication for the role of migratory birds in global spread of avian rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.103, n.2, 2022a. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001722>

FUJII, Y.; MASATANI, T.; NISHIYAMA, S.; OKAJIMA, M.; IZUMI, F.; OKAZAKI, K.; SAKODA, Y.; TAKADA, A.; OZAWA, M.; SUGIYAMA, M.; ITO, N. Molecular

characterisation of a novel avian rotavirus A strain detected from a gull species (*Larus* sp.). **Journal of General Virology**, v. 103, n.10, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001792>

GALLEGO, J.C.; LORENCENA, D.; DE MELLO, J.L.; DELAI, R.R.; DE MATOS, M.R.; VIOTT, A.M.; LORENZETTI, E.; ALFIERI, A.A.; FERNANDES, S.R.; TAKIUCHI, E. Investigation of avian rotavirus infections in broiler chicks from commercial flocks with different performance efficiency indexes. **Veterinary Research Communications**, v. 46, p. 853-858, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-022-09910-x>

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

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses. Official ICVT 2021 taxonomy. 2021. Disponível em: <<https://ictv.global/taxonomy>> Acess em: 12 october 2022.

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**, v.412, p.384-391, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.031>

KATTOOR, J.J.; MALIK, Y.S.; SHARMA, K.; KUMAR, N.; BATRA, M.; JINDAL, N.; YADAV, A.S. Molecular evidence of group D rotavirus in commercial broiler chicks in India. **Avian Biology Research**, v.6, p.313-316, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3184/175815513X13833072000>

KOO, B.S.; LEE, H.R.; JEON, E.O.; HAN, M.S.; MIN, K.C.; LEE, S.B.; MO, I.P. Molecular survey of enteric viruses in commercial chicken farms in Korea with a history of enteritis. **Poultry Science**, v.92, p.2876-2885, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03280>

LINE, J.; HIETT, K.; CONLAN, A. Comparison of Challenge Models for Determining the Colonization Dose of *Campylobacter jejuni* in Broiler Chicks. **Poultry Science**, v.87, p.1700-1706, 2008. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00027>

MALIK, Y.S.; BHAT, S.; DAR, P.S.; SIRCAR, S.; DHAMA, K.; SINGH, R.J. Evolving Rotaviruses, interspecies transmission and zoonoses. **The Open Virology Journal**, v.14, p.1-6, 2020. <https://doi.org/10.2174/1874357902014010001>

MASCARENHAS, J.D.P.; BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; SILVA, M.J.M.; SOUZA, E.C.J.; SOARES, L. Detection of the VP6 gene of group F and G rotaviruses in broiler chicken fecal samples from the Amazon region of Brazil. **Archives of Virology**, v.161, p.2263-2268, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2882-z>

MATHIEU, M.; PETITPAS, I.; NAVAZA, J.; LEPAULT, J.; KOHLI, E.; POTHIER, P.; PRASAD, B.V.V.; COHEN, J.; REY, F.A. Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus: implications for the architecture of the virion. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v.20, p.1485-1497, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1485>

METTIFOGO, E.; NUÑEZ, L.F.; CHACÓN, J.L.; SANTANDER, P.S.H.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; JEREZ, J.A.; JONES, R.C.; PIANTINO, A.J.F. Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health. **Scientific World Journal**, v.9, 2014. DOI: [10.1155/2014/450423](https://doi.org/10.1155/2014/450423)

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, p. 8-15, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.001>

OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M.; REETZ, J.; LÖHREN, U.; DILLER, R. Detection of Rotaviruses and Intestinal Lesions in Broiler Chicks from Flocks with Runting and Stunting Syndrome (RSS). **Avian Diseases**, v.50, p.411-418, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/7511-020106R.1>

PAULY, M.; ONI, O.O.; SAUSY, A.; OWOADE, A.A.; ADEYEFA, C.A.O.; MULLER, C.P.; HÜBSCHEN, J.M.; SNOECK, C.J. Molecular epidemiology of Avian Rotaviruses Group A and D shed by different bird species in Nigeria. **Virology Journal**, v.14, 111, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0778-5>

PICKETT BE, GREER DS, ZHANG Y, STEWART L, ZHOU L, SUN G, GU Z, KUMAR S, ZAREMBA S, LARSEN CN, JEN W, KLEM EB, SCHEUERMANN RH. **Viruses**, v.19 p.3209-26, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3390/v4113209>

PINHEIRO, M.S.; DIAS, J.B.; CUNHA, B.R.A.V.; PETRUCCI, M.P.; TRAVASSOS, C.E.P.F.; MENDES, G.S.; SANTOS, N. Rotavirus F and G circulating in chickens in Southeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.54, n.113, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03113-x>

ROHWEDDER, A.; IRMAK, H.; WERCHAU, H.; BRÜSSOW, H. Nucleotide Sequence of Gene 6 of Avian-like Group A Rotavirus 993/83. **Virology**, v.195, p.820-825, 1993.

SCUARCIALUPI, L.N.; BESERRA, L.A.R.; HOCHHEIM, J.R.; SOARES, R.M.; GREGORI, F. Genetic Characterization of Avian Rotavirus Groups F and G in Brazilian Farms. **Hosts and Viruses**, v.5, n.2, p.12-16, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.hv/2018/5.2.12.1>

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses, **Virology**, v. 386, p.334-343, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.040>

SILVA, R.R.; BEZERRA, D.A.M.; KAIANO, J.H.L.; MANNO, M.C.; OLIVEIRA, D.S.; SAGICA, F.E.S.; GABBAY, Y.B.; CHAVES, S.O.C.; SILVA, A.L.C.; ALFIERI, A.A.; MASCARENHAS, J.D.P. Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples of broiler chickens in Amazon Region, Brazil, from August 2008 to May 2011. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.4, n.2, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232013000200007>

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR S. MEGA6:

Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

THOMPSON, JULIE D., DESMOND G. HIGGINS, AND TOBY J. GIBSON. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** v.22, p.4673-4680, 1994.

TROJNAR, E.; OTTO, P.; JOHNE, R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Virology**, v.386, p.325-333, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.034>

Table 1. Specific RT-PCR primers used for amplifying VP6 gene and sequence of avian rotavirus field strains with information about the size of the expected amplicons, position in the genome based on the prototype strains and reference.

Avian rotavirus species	Amplicon size (bp)	Nucleotide position *	Reference
RVA	787	317 to 1104	Schumann <i>et al.</i> (2009)
RVD	741	24 to 765	Bezerra <i>et al.</i> (2012)
RVF	875	53 to 928	Mascarenhas <i>et al.</i> (2016)
RVG	1034	11 to 1045	Mascarenhas <i>et al.</i> (2016)

* According to the reference strain: RVA 06V066, GenBank accession number: EU486969; RVD 06V0047, GenBank accession number: JN034679; RVF 03V0568, GenBank accession number: NC021635; and RVG 03V0567, GenBank accession number: NC021588.

Table 2. Comparison of the structure of partial VP6 gene analysis of rotavirus species A strains corresponding to the 349 to 1078 nucleotides. Schematic presentation of the localization of the amino acid (aa) substitutions. The numbers above correspond to the aa position compared with reference strain 06V0661 (GenBank accession number: EU486969). The sequences obtained in this study are marked in bold plus ■ symbol.

	Amino acid position number															
										1	1	1	1	1	1	2
	1	2	2	6	6	8	8	9	2	3	4	5	6	6	0	
Avian rotavirus strains	2	4	5	5	7	4	6	8	2	4	2	6	8	9	0	
EU486969/RVA/Ch/06V0661/DEU/2006/I11	Y	D	M	C	T	D	H	V	I	D	K	V	N	F	N	
■ MZ964147/RVA/Ch-wt/VP6APR_103/BRA/2015/I11G19	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_203/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_206/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_210/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_299/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_305/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_312/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_313/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_316/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
■ RVA/Ch-wt/VP6APR_319/BRA/2015/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
KX198699/RVA/Av/198/15/BRA/2015/G19P31-I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
KX198690/RVA/Av/09/BRA/2009/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
KX198692/RVA/Av/22/08/BRA/2008/G19P31-I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	V	E	N	N	K	K	T	
EU486968/RVA/Ch/04V0027G6/DEU/2004/G19P30-I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
EU486966/RVA/Ch/03V0158G3/DEU/2003/I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
KC593402/RVA/Ch/ADL101778-AvRV/KOR/2010/G19P30-I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N
JQ085406/RVA/Ch/AvRV-2/KOR/2011/19P30-I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N

KU372570/RVA/Ch/NIE11_A_250/NGA/2011/G19PX-I11	N	N	L	W	N	N	Q	L	.	.	N	.	.	.
--	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

BRA: Brasil; DEU: Alemanha; KOR: Coreia; NGA: Nigéria; Ch: chicken; wt: wild type;

Figure 1. Phylogenetic tree based on the partial (390 bp) nucleotide (nt) sequences of the VP6 gene from the avian rotavirus species A (RVA), D (RVD), and F (RVF) described in this study and representative strains from avian RV species. The tree was constructed using the Maximum likelihood method with the Tamura 3-parameter model plus gamma distribution for nt substitution. The bootstrap values greater than 50% are shown. The GenBank accession numbers of the strains are provided. The 33 VP6 nt sequences from this study are indicated with a black square, circle, and inverted triangle for the avian RVA, RVD, and RVF, respectively. The VP6 gene sequence of the RVG were used as outgroup.

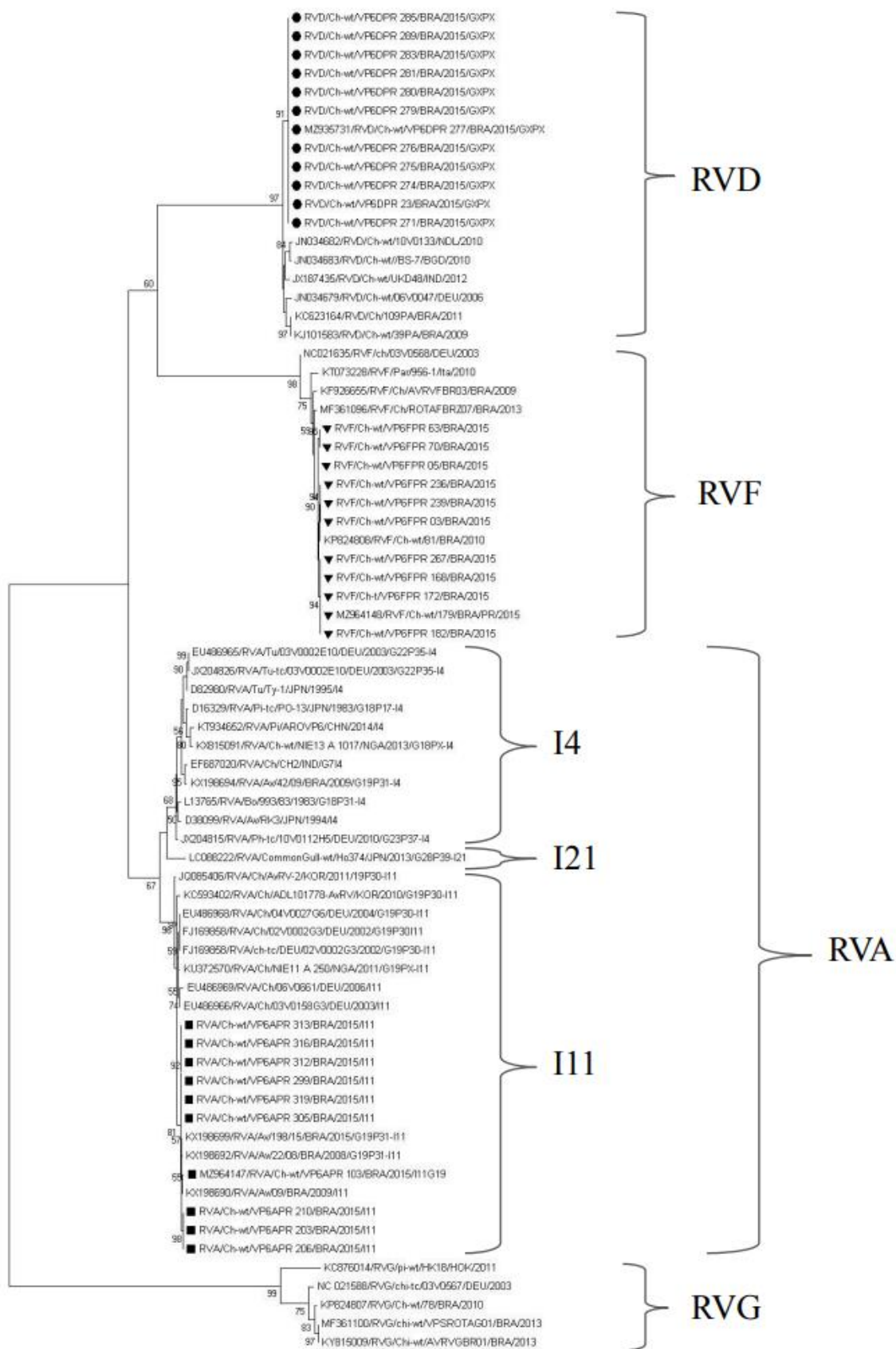


Table 3. Comparison of the structure of partial VP6 gene analysis of rotavirus species D strains corresponding to the 25 to 754 nucleotides. Schematic presentation of the localization of the amino acid (aa) substitutions. The numbers above correspond to the aa position compared with reference strain 06V0047 (GenBank accession number: JN034679). The sequences obtained in this study are marked in bold plus ● symbol.

	Amino acid position number								
						1	1	2	2
Avian rotavirus strains	1	1	1	1	9	0	5	3	3
	2	4	5	6	7	6	3	2	4
Prototype - JN034679/RVD/Ch-wt/06V0047/DEU/2006	A	T	I	R	V	V	M	I	E
Prototype - NC014516/RVD/chi-tc/05V0049/DEU/2005	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_23/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_271/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_274/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_275/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_276/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● MZ935731/RVD/Ch-wt/VP6DPR_277/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_279/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_280/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_281/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_283/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_285/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
● RVD/Ch-wt/VP6DPR_289/BRA/2015/GXP[X]	.	.	V	.	I	.	.	.	D
JN034682/RVD/Ch-wt/10V0133/NDL/2010	.	.	V	.	I	.	.	.	D
JN034683/RVD/Ch-wt//BS-7/BGD/2010	.	.	V	.	I	I	.	.	D
JX187435/RVD/Ch-wt/UKD48/IND/2012	.	.	V	.	I	.	T	M	D
KC623164/RVD/Ch/109PA/BRA/2011	.	.	V	K	I	.	.	.	D
JN034684/RVD/Ch-wt/HS-58/BGD/2010	.	.	V	.	I	I	.	.	D
JN034685/RVD/Ch-wt/MJ-5/BGD/2010	I	A	V	.	I	I	.	.	D
KJ101583/RVD/Ch-wt/39PA/BRA/2009	.	.	V	.	I	.	.	.	D
KJ101584/RVD/Ch-wt/40PA/BRA/2009	.	.	V	.	I	.	.	.	D

BRA: Brasil; BGD: Bangladesh; IND: India; DEU: Alemanha; NDL: Países Baixos; Ch: chicken; wt: wild type; tc: tissue culture

Table 4. Comparison of the structure of partial VP6 gene sequence analysis of rotavirus species F strains corresponding to the 90 to 870 nucleotides. Schematic presentation of the localization of the amino acid (aa) substitutions. The numbers above correspond to the aa position compared with reference strain 03V0568 (GenBank accession number: NC021635). The sequences obtained in this study are marked in bold plus ▼ symbol.

Avian rotavirus strains	Amino acid position number												
					1	1	1	1	1	2	2	2	2
	3	3	5	6	1	2	7	7	8	3	4	5	9
Prototype - NC021635/RVF/ch/03V0568/DEU/2003	S	I	I	T	T	T	I	A	N	G	V	V	I
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_63/BRA/2015	F	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_70/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_05/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_236/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_239/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_03/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_267/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_168/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-t/VP6FPR_172/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ MZ964148/RVF/Ch-wt/179/BRA/PR/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
▼ RVF/Ch-wt/VP6FPR_182/BRA/2015	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
KT073228/RVF/Par/956-1/Ita/2010	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
KF926655/RVF/Ch/AVRVFBR03/BRA/2009	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
MF361096/RVF/Ch/ROTAfBRZ07/BRA/2013	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V
KP824808/RVF/Ch-wt/81/BRA/2010	.	V	V	A	M	A	V	P	D	D	I	A	V

BRA: Brasil; ITA: Itália; DEU: Alemanha; Ch: chicken; wt: wild type

4.2 DETERMINATION OF VP7 GENE (GENOTYPE G) OF AVIAN ROTAVIRUS SPECIES A AND D IDENTIFIED IN DIARRHEIC BROILER CHICKENS

ABSTRACT

Avian rotavirus (RV) is a relevant cause of enteric infection in poultry worldwide. Avian rotaviruses can cause diarrhea, dehydration, reduction in weight gain, non-uniformity of the flocks, and high discard rates. The VP7 gene of RV encodes a major protein of the outer capsid that induces neutralizing antibodies. Characterizing the G genotype (VP7 gene) of RV field strains is relevant for defining epidemiological aspects of the infection. This study aimed to determine the genotype G of avian RV species A (RVA) and D (RVD) previously diagnosed by species-specific (VP6 gene) RT-PCR assay. The avian RV strains were identified in a collection of 19 intestinal contents obtained from runt broiler chickens aged between one and two weeks old with diarrhea and clinical signs of malabsorption syndrome. The partial VP7 gene of avian RVA ($n=7$ strains) and RVD ($n=12$ strains) were amplified by RT-PCR assay and the amplicons were sequenced. Six RVA and nine RVD sequences presented sufficient quality to perform the analysis. The avian RVA strains showed 95 to 97% of nucleotide (nt) identity with genotype G19 sequences available in GenBank. The avian RVD strains present 85% and 89 to 91% of nt identity with the 05V0049 prototype strain and other worldwide available RVD strains, respectively. Comparing the amino acid (aa) substitutions of the avian RVA and RVD strains analyzed in this study with the respective sequences of the prototype strains were identified 17 and 28 aa substitutions, respectively. The number of aa substitutions in the VP7 protein, both from RVA and RVD strains, identified in this study showed the importance of conducting complementary molecular studies in Brazilian field strains of avian RV to understand the evolution, reassortment, and interspecies transmission.

Keywords: Avian rotaviruses; poultry; diarrhea; runting-stunting syndrome, malabsorption syndrome.

INTRODUCTION

Avian rotavirus (RV) is a relevant cause of enteric infection in poultry worldwide, which results in diarrhea and dehydration (Dhama *et al.*, 2015). Avian RV, together with other enteropathogens, are involved in clinical syndromes in young broilers generically called runting-stunting syndrome (RSS) or malabsorption syndrome (Dhama *et al.*, 2015). Poultry flocks with RSS show a reduction in weight gain, non-uniformity of the flocks, and high discard rates (Otto *et al.*, 2012).

Based on the VP6 protein of the middle layer of the capsid, the RV strains are classified into nine species named A to D and F to J (ICTV, 2021). RVA can infect birds and mammals, so the RVD, RVF, and RVG species have been reported only on avian hosts (Kattoor *et al.*, 2013; Otto *et al.*, 2012). The RVA and RVD are the most reported species in avian hosts (Otto *et al.*, 2012).

RVA species is classified by a binary genotype system based on the VP7 (glycoprotein, G genotype) and VP4 (protease-sensitive protein, P genotype) proteins are being used for the understanding of RV evolution, reassortment, and interspecies transmission events (Desselberger, 2014; Matthijssens *et al.*, 2008). More than 35 different glycoprotein (G) genotypes (VP7 gene) and 50 different protease (P) genotypes (VP4 gene) have been recognized (Alárcon *et al.*, 2022). At least 14 G and 11 P genotypes have been reported in domestic and wild avian species (Alárcon *et al.*, 2022). The G19 and G18 are the most reported genotypes, mainly from commercial chicken, guinea fowl, and doves (Alárcon *et al.*, 2022).

The molecular studies on RVD are progressively updating in the public database, however, the lack of gene sequences restricts the development of RVD classification into different genotypes (Deol *et al.*, 2017; Matthijssens *et al.*, 2012). The VP6 gene sequences from RVD show high identity but with geographical segregation between the strains from India, Europe, and Brazil (Beserra *et al.*, 2015; Kattoor *et al.*, 2013). As in avian RVA strains, the VP7 gene of RVD also exhibited divergence (Trojnar *et al.*, 2010). Also, 80% nucleotide (nt) and 90% amino acid (aa) identities along the full-length VP7 gene have been suggested as the cutoff value to classify different VP7 genotypes from avian RVA (Ursu *et al.*, 2009). Animal RV diversity may contribute to genetic variability by direct transmission or by reassortment events with human RV strains (Duarte *et al.*, 2020; Martella *et al.*, 2010; Trojnar *et al.*,

2013;). More studies and available sequences are necessary to evaluate the genetic diversity and distribution of avian RV species (Patzina-Mehling *et al.*, 2020).

This study aimed to determine the genotype G of avian RV species A (RVA) and D (RVD) previously identified by a VP6 gene species-specific RT-PCR assays.

MATERIALS AND METHODS

Ethics approval

The experimental procedure agrees with the ethical principles compiled by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) that was approved by the Animals Use Ethics Committee (CEUA/protocol number 15/2014) of the Universidade Federal do Parana.

Biological samples

Nineteen intestinal contents from small-sized (runts) broiler chicks (Cobb 500 breed) were previously identified with positive for RVA ($n=7$) and RVD ($n=12$) by a VP6 gene species-specific RT-PCR assay. The samples were obtained in 2015 from individual chicks at one to two weeks old with diarrhea and clinical signs of malabsorption syndrome (Gallego *et al.*, 2022). All RV-positive samples belong to a collection of the Animal Virology Laboratory from the Universidade Federal do Parana and were kept stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until processing.

Nucleic acid extraction

For nucleic acid extraction the intestinal contents are eluted (10% w/v) in Tris/Calcium buffer (10 mM Tris-HCl; 1.5 mM CaCl_2 ; pH 7.3) and were centrifuged at $5,000\times g$ for 10 min. Aliquots of 500 μL of supernatants were treated with sodium dodecyl sulfate (1% final concentration) and incubated for 30 min at $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. A combination of the phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidine isothiocyanate methods (Alfieri *et al.*, 2006) was used for nucleic acid extraction. The nucleic acid was eluted in 50 μL of ultrapure sterile water treated with diethylpyrocarbonate (DPEC) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). DPEC water was used as a negative control. Positive fecal samples for each avian RV species evaluated were included as positive controls.

RT-PCR assay

The extracted nucleic acids were submitted to RT-PCR assays with specific primers for partial amplification of the VP7 gene of avian RVA (Beserra *et al.*, 2014) and RVD (Bezerra *et al.*, 2014). The primers amplify fragments with 888 and 838 base pairs (bp) of the VP7 gene of avian RVA and RVD, respectively, and the RT-PCR assays were performed using the same conditions described previously (Beserra *et al.*, 2014; Bezerra *et al.*, 2014).

Sequencing and phylogenetic analysis

The amplicons obtained were purified using the PureLink[®] Quick Gel Extraction and PCR Purification combo kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The quantification was carried out using a Qubit[™] fluorometer with Quant-iT[™] dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA). The sequencing reactions were performed in both directions with the same forward and reverse primers used in specific RT-PCR assays in an ABI3500 Genetic Analyzer sequencer with BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The nt sequence quality analysis was performed using PHRED software. The consensus sequences were assembled using the CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). The nucleotide sequence similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Additionally, nt sequences were submitted to the Virus Pathogen Database and Analysis Resource (<http://www.viprbrc.org/>) automated genotyping tool to confirm the RVA G genotype (Pickett *et al.*, 2012). The nt sequences were aligned with representative strains of RV species retrieved from GenBank with ClustalW (Thompson *et al.*, 2013). The phylogenetic tree was constructed using the maximum composite likelihood (ML) method with Tamura-3-parameter model plus gamma distribution (T92+G) and 1,000 bootstraps replicate using the MEGA software package (Version 6.0) (Tamura *et al.*, 2013). The nt substitution model was determined according to the find best model analysis implemented in MEGA software. The nt sequence identity matrix was obtained using BioEdit software version 7.2 (Hall, 1999).

RESULTS

Of the seven RVA-positive samples included in the VP7 analysis, the sequencing of amplicons with 830 bp (nt 25 to 855) from six allowed classifying them as the genotype G19 genotype.

The analysis of RVA strains exhibited a high degree of identity to each other (95 to 100%), 95 to 97% of nt identity with other Brazilian RVA strains previously described, and 92 to 93% of nt identity with the prototype strain 04V0027G6 (GenBank accession number: EU486976). The phylogenetic tree based on the partial (816 nt) VP7 gene showed that the Brazilian RVA strains grouped on the G19 genotype branch (Figure 1). The analysis of the deduced amino acid (aa) of the VP7PR_312 and VP7PR_103 strains revealed, respectively, 11 and 14 aa substitutions with the prototype strain, plus 5 and 4 divergences compared with the sequence from Brazil (Table 1).

The twelve RVD partial nt sequences generate fragments of 788 bp, corresponding to 74 to 862 nt of the reference strain 05V0049 (GenBank accession number: NC014519). The analysis of the RVD sequences described herein presented 100% of nt to each other. Upon checking with RVD Brazilian strains from Para state the nt identity ranged from 89 to 91% and with the 05V0049 German prototype was 85%. The RVD strains from this study formed a separate single cluster out of the other RVD strains previously described, including other Brazilian strains. The analysis of the deduced aa sequences showed 28 substitutions and 25 divergences in comparison with the other RVD sequences from prototype strain and Brazilian strains, respectively (Table 2).

The VP7 sequences of the RVA and RVD described in this study are available in GenBank about the accession numbers: xxx to xxx and xxx to xxx, respectively.

DISCUSSION

The phylogenetic analysis showed that in this study, the VP7 gene of avian RVA strains segregated with the G19 genotype and the clade includes avian RVA strains from Brazil, the United Kingdom, and Germany (Beserra *et al.*, 2014).

The RVA variability detected in strains from Brazil showed eight different VP7 genotypes across many avian species until now and is indicated with a black

square in Table 3. G19 is the most common G genotype reported from broiler chickens worldwide (Beserra *et al.*, 2020; Patzina-Mehling *et al.*, 2020; Pauly *et al.*, 2017; Schumann *et al.*, 2009; Trojnar *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2013).

From Brazilian broiler poultry flocks the G5, G8, G11, and G19 genotypes of RVA were reported, and the G19 is reported previously on the Paraná state (Beserra *et al.*, 2020; Beserra *et al.*, 2014). The G10 genotype was detected in ostrich from the Parana state just by RT-PCR assay (Silva *et al.*, 2012). The G6 genotype, considered a typical bovine genotype, was reported on turkey from the South of Brazil by RT-PCR assay (Asano *et al.*, 2011). A study that evaluated 23 RVA strains from avian wildlife from Para state, northwest of Brazil, detected by RT-qPCR the G1, G3, and G6 genotypes (Duarte *et al.*, 2020).

Worldwide, other RVA G genotypes were detected in avian hosts, for example, G17 and G22 in turkey from the United Kingdom (Kool; Holmes, 1993) and Germany (Schumann *et al.*, 2009), respectively. In Japan, the G18 genotype has been detected in pigeon (Ito *et al.*, 2001) and velvet ducks (*Melanitta fusca*) (Fujii *et al.*, 2022a) samples, and the G23 in pheasant from Germany and Hungary (Trojnar *et al.*, 2013; Ursu *et al.*, 2009). Finally, the last genotype described from an avian host was the G28 genotype in a Japanese common gull (Fujii *et al.*, 2022b).

Regarding the zoonotic transmission, the molecular analysis of the G1 genotype from Brazilian wild avian showed 98% nt identity with the human RVA Russian strain (Duarte *et al.*, 2020). The G6 genotype from another Brazilian wild avian exhibited 95% nt identity with the RVA human African strain (Duarte *et al.*, 2020). The G3 genotypes showed 98 and 99% nt identity when compared with human RVA strains from Japan and Brazil (Amazonas state), supporting the possible transboundary way or reassortment of RVA genotypes (Duarte *et al.*, 2020). The G6 is a typical bovine genotype, still reported in turkey and ostriches with enteritidis from Brazilian production farms (Silva *et al.*, 2012; Asano *et al.*, 2011). The G8 considered a bovine genotype and G5 and G11 porcine genotypes have been identified from Brazilian poultry farms (Beserra *et al.*, 2014). Besides the G5 genotype has been detected in children with diarrhea in some countries such as Brazil, Republic of Cameroon, Vietnam, and China (Esona *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2007; Leite *et al.*, 1996). The G10 is a common bovine genotype, also detected in ostriches from Brazil (Silva *et al.*, 2012).

The animal RVA could play a role in further genetic diversity for human RVA strains, mainly with nearby urban, rural, and wild ecosystems (Duarte *et al.*, 2020). All

these interspecies possible routes reports improve the database and enhance the surveillance of RVA G genotypes from avian hosts as is already done in RVA strains of humans and livestock (bovine and porcine) as well wild hosts. These studies are necessary to amplify the knowledge of virus evolution, reassortment, and transboundary transmission at RV (Pinheiro *et al.*, 2022; Martella *et al.* 2010).

The VP7 gene of the RVD strains from this study formed a separate single cluster out of the other RVD strains, including strains from Brazil and the outer branch with the prototype strain (Bezerra *et al.*, 2014; Trojnar *et al.*, 2010). At present, besides the nine sequences obtained in this study, only 29 partial nt sequences of the VP7 gene of RVD strains, obtained using the Sanger sequencing are available in the database of GenBank (Guerreiro *et al.*, 2018; Pauly *et al.*, 2017; Bezerra *et al.*, 2014; Trojnar *et al.*, 2010). The eight Nigerian sequences and one Sandpiper bird strain from Brazil are not included in this analysis because it is too short compared with nt sequences of this study (Guerreiro *et al.*, 2018; Pauly *et al.*, 2017). The VP7 nt sequences of the RVA and RVD strains the deduced aa sequences identified 17 and 28 aa substitutions, respectively. This data shows the lack of available VP7 gene sequences mainly from non-RVA species to compare and estimate the mutation taxes.

This data projects a necessity that binary classification by Matthijnsens and colleagues (2011) be updated and extended for non-RVA species. However, the genotypes and serotype specificity of the avian RVA VP7 gene are not yet well understood (Ursu *et al.*, 2009; Matthijnsens *et al.*, 2008).

Conclusion

This study describes the molecular characterization of the VP7 gene from RVA and RVD strains identified in runt broiler chickens from southern Brazil. The G19 genotype detected is the most common in RVA strains for avian species. The RVD strains grouped in a distinct single cluster from the other strains previously described in Brazil and the prototype strain. In deduced aa analysis performed in this study, the aa substitutions were identified in RVA and RVD field strains including the VP7 antigenic epitopes regions. Compared with RV strains from mammals, mainly from humans, cattle, and pigs, worldwide, the molecular characterization of avian RV strains is not frequent. These results stimulate and support that classical and molecular epidemiological surveillance studies should be conducted to characterize the

genotypes of VP7 and VP6 genes of wild-type field strains of all RV species from avian hosts.

Acknowledgments

The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support: the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), the Araucaria Foundation (FAP/PR), the Laboratory of Animal Virology from Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, and the Laboratory of Animal Virology from Universidade Federal do Parana.

REFERENCES

- ALARCÓN, R.G.D.; LIOTTA, D.J.; MIÑO S. Zoonotic RVA: State of the Art and Distribution in the Animal World. **Viruses**, v.14, p.2-26, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14112554>
- ALFIERI, A.A.; PARAZZI, M.E.; TAKIUCHI, E.; MÉDICI, K.C.; ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. **Tropical Animal Health Production**, v.38, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4349-9>
- ASANO, K.M.; GREGORI, F.; SOUZA, S.P.; ROTAVA, D.; OLIVEIRA R.N.; VILLAREAL, L.Y.; RICHTZENHAIN, L.J.; BRANDÃO, P.E. Bovine rotavirus in turkeys with enteritis. **Avian Diseases**, v.55, n.4, p.697-701, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1637/9765-041911-ResNote.1>
- BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, C.M.; BERG, M.; BRANDÃO, P.E.; SOARES, R.M.; GREGORI, F. Genome constellations of rotavirus a isolated from avian species in Brazil, 2008–2015. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.51, p.1363-1375, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00259-4>
- BESERRA, L.A.R.; BARBOSA, B.R.P; BERNARDES, N.T.C.G.; BRANDÃO, P.E.; GREGORI, F. Occurrence and Characterization of Rotavirus A in Broilers, Layers, and Broiler Breeders from Brazilian Poultry Farms. **Avian Diseases**, v.58, p.153-154, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1637/10626-080513-ResNote.1>
- BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; KAIANO, J.H.L.; OLIVEIRA, D.S.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B.; LINHARES, A.C.; MASCARENHAS, J.D.P. Detection, epidemiology and characterization of VP6 and VP7 genes of group D rotavirus in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.43, n.3, p.238-243, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2014.913097>

DESSELBERGER, U. Rotaviruses. **Virus Research**, v.190, p.75-96, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016>

DUAN, Z.J.; LI, D.; ZHANG, Q.; LIU, N.; HUANG, C.; JIANG, X.; JIANG, B.; GLASS, R.; STEELE, D.; TANG, J.; WANG, Z.; FANG, Z. Novel Human Rotavirus of Genotype G5P[6] Identified in a Stool Specimen from a Chinese Girl with Diarrhea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.1614-1617, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00032-07>

DUARTE JÚNIOR, J.W.B.; CHAGAS, E.H.N.; SERRA, A.C.S.; SOUTO, L.C.S.; PENHA JÚNIOR, E.T.; BANDEIRA, R.S.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; OLIVEIRA, H.G.S.; SOUSA, T.K.S.; LOPES, C.T.A.; DOMINGUES, S.F.S.; PINHEIRO, H.H.C.; MALIK, Y.S.; SALVARANI, F.M.; MASCARENHAS, J.D.P. Occurrence of rotavirus and picobirnavirus in wild and exotic avian from amazon forest. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.15, n.9, p.1-18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008792>

ESONA, M.; GEYER, A.; BANYAI, K.; PAGE, N.; AMINU, M.; ARMAH, G.; HULL, J.; STEELE, D.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Novel Human Rotavirus Genotype G5P[7] from Child with Diarrhea, Cameroon. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p83-83, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1501.080899>.

FUJII, Y.; HIRAYAMA, M.; NISHIYAMA, S.; TAKAHASHI, T.; OKAJIMA, M.; IZUMI, F.; TAKEHARA, K.; MASATANI, T.; SUGIYAMA, M.; ITO, N. Characterization of an avian rotavirus A strain isolated from A velvet scoter (*Melanitta fusca*): implication for the role of migratory birds in global spread of avian rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.103, n.2, 2022a. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001722>

FUJII, Y.; MASATANI, T.; NISHIYAMA, S.; OKAJIMA, M.; IZUMI, F.; OKAZAKI, K.; SAKODA, Y.; TAKADA, A.; OZAWA, M.; SUGIYAMA, M.; ITO, N. Molecular characterisation of a novel avian rotavirus A strain detected from a gull species (*Larus* sp.). **Journal of General Virology**, v. 103, n.10, 2022b. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001792>

GUERREIRO, A.N.; MORAES, C.C.G.; MARINHO, A.N.R.; BARROS, B.C.V.; BEZERRA, D.A.M.; BANDEIRA, R.S.; SILVA, R.R.; ROCHA, D.C.C.; MENESES, A.M.C.; LUZ, M.A.; PAZ, G.S.; MASCARENHAS, J.D.P. Investigation of enteric viruses in the feces of neotropical migratory birds captured on the coast of the State of Pará, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.20, n.1, p.161-168, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2017-0589>

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

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, p.123-138, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00234-9)

KATTOOR, J.J.; MALIK, Y.S.; SHARMA, K.; KUMAR, N.; BATRA, M.; JINDAL, N.; YADAV, A.S. Molecular evidence of group D rotavirus in commercial broiler chicks in India. **Avian Biology Research**, v.6, p.313-316, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3184/175815513X13833072000>

KOOL, D.A.; HOLMES, I.H. The avian rotavirus Ty-1 Vp7 nucleotide and deduced amino acid sequences differ significantly from those of Ch-2 rotavirus. **Archives of Virology**, v.129, p.227-234, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01316897>

LEITE, J.P.G.; ALFIERI, A.A.; WOODS, P.A.; GLASS, R.I.; GENTSCH, J.R. Rotavirus G and P types circulating in Brazil: characterization by RT-PCR, probe hybridization, and sequence analysis. **Archives of Virology**, v.141, p.2365-2374, 1996.

MARTELLA, V.; BÁNYAI, K.; MATTHIJNSSENS, J.; BUONAVOGLIA, C.; CIARLET, M. Zoonotic aspects of rotaviruses. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.246-255, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.028>

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PATTON J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotavirus using all 11 genomic RNA segments. **Archives of Virology**, v.153, p.1621-1629, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; MCDONALD, S.M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; BRISTER, J.R.; BUESA, J.; ESONA, M.D.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; JOHNE, R.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.C.; NAKAGOMI, O.; PARREÑO, V.; RAHMAN, M.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; PATTON, J.T.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). **Archives of Virology**, v.156, n.8, p.1397-1413, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>

MATTHIJNSSENS, J.; OTTO, P.H.; CIARLET, M.; DESSELBERGER, U. VAN RANST, M. JOHNE, R. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. **Archives of Virology**, v.157, p.1177-82, 2012 DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1273-3>

NISHIKAWA, K.; HOSHINO, Y.; GORZIGLIA, M. Sequence of the VP7 gene of chicken rotavirus Ch2 strain of serotype 7 rotavirus. **Virology**, v.185, n.2, p.853-856, 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90558-s](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90558-s)

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, p. 8-15, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.10.001>

PATZINA-MEHLING, C.; FALKENHAGEN, A.; GADICHERLA, A.K.; GRÜTZKE, J.; TAUSCH S.H.; JOHNE, R. Whole genome sequence analysis of cell culture-adapted

rotavirus A strains from chicken. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 81, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104275>

PAULY, M.; ONI, O.O.; SAUSY, A.; OWOADE, A.A.; ADEYEFA, C.A.O.; MULLER, C.P.; HÜBSCHEN, J.M.; SNOECK, C.J. Molecular epidemiology of Avian Rotaviruses Group A and D shed by different bird species in Nigeria. **Virology Journal**, v.14, 111, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0778-5>

PICKETT, B.E.; GREER, D.S.; ZHANG, Y.; STEWART, L.; ZHOU, L.; SUN, G.; GU, Z.; KUMAR, S.; ZAREMBA, S.; LARSEN, C.N.; JEN, W.; KLEM, E.B.; SCHEUERMANN, R.H. **Viruses**, v.19 p.3209-26, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3390/v4113209>

PINHEIRO, M.S.; DIAS, J.B.; CUNHA, B.R.A.V.; PETRUCCI, M.P.; TRAVASSOS, C.E.P.F.; MENDES, G.S.; SANTOS, N. Rotavirus F and G circulating in chickens in Southeastern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v.54, n.113, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03113-x>

SCHUMANN, T.; HOTZEL, H.; OTTO, P.; JOHNE, R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses, **Virology**, v. 386, p.334-343, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.040>

SILVA, R.R.; BEZERRA, D.A.M.; KAIANO, J.H.L.; MANNO, M.C.; OLIVEIRA, D.S.; SAGICA, F.E.S.; GABBAY, Y.B.; CHAVES, S.O.C.; SILVA, A.L.C.; ALFIERI, A.A.; MASCARENHAS, J.D.P. Molecular epidemiology of avian rotavirus in fecal samples of broiler chickens in Amazon Region, Brazil, from August 2008 to May 2011. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.4, n.2, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232013000200007>

SILVA, L.C.; SANCHES, A.A.; GREGORI, F.; BRANDÃO, 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**, v.93, n.2, p.1066-1069, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.12.007>

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, p.2725-2729, 2013.

THOMPSON, JULIE D., DESMOND G. HIGGINS, AND TOBY J. GIBSON. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research** v.22, p.4673-4680, 1994.

TROJNAR, E.; SACHSENROEDER, J.; TWARDZIOK, S.; REETZ, J.; OTTO, P.H.; JOHNE, R. Identification of an avian group A rotavirus containing a novel VP4 gene with a close relationship to those of mammalian rotaviruses. **Journal of General Virology**, v.94, n.1, p.136-142, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.047381-0>

TROJNAR, E.; OTTO, P.; ROTH, B.; REETZ, J.; JOHNE, R. The Genome Segments of a Group D Rotavirus Possess Group A-Like Conserved Termini but Encode Group-

Specific Proteins. **Journal of Virology**, v.84, p.10254-10265, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00332-10>

TROJNAR, E.; OTTO, P.; JOHNE, R. The first complete genome sequence of a chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. **Virology**, v.386, p.325-333, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.01.034>

URSU, K.; KISFALI, P.; RIGÓ, D.; IVANICS, E.; ERDÉLYI, K.; DAN, A.; MELEGH, B.; MARTELLA, V.; BÁNYAI, K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. **Archives of Virology**, v. 154, p. 1365-1369, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0439-0>

WANG, J.H.; KOO, B.S.; MO, I.P.; KANG, S.Y. Molecular characterization of avian rotavirus isolated in Korea. **Korean Journal of Veterinary Service**, v.36, n.1, p.23-30, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.7853/kjvs.2013.36.1.23>

Figure 1. Nucleotide maximum likelihood distance tree with Tamura 3-parameter model plus gamma and evolutionarily invariable substitution for the partial nt sequences (816 bp) of the VP7 gene obtained from avian rotavirus species A (RVA) and D (RVD) strains from the Parana state, South Brazil. The GenBank accession numbers at each node are bootstrap values greater than 50%. The 15 nucleotide RV sequences from this study are marked with a black circle and square for the avian RVA and RVD, respectively. Sequences from common G genotypes already described in avian hosts are included. The RVF (03V0568) and RVG (03V0567) strains were included as outgroup.

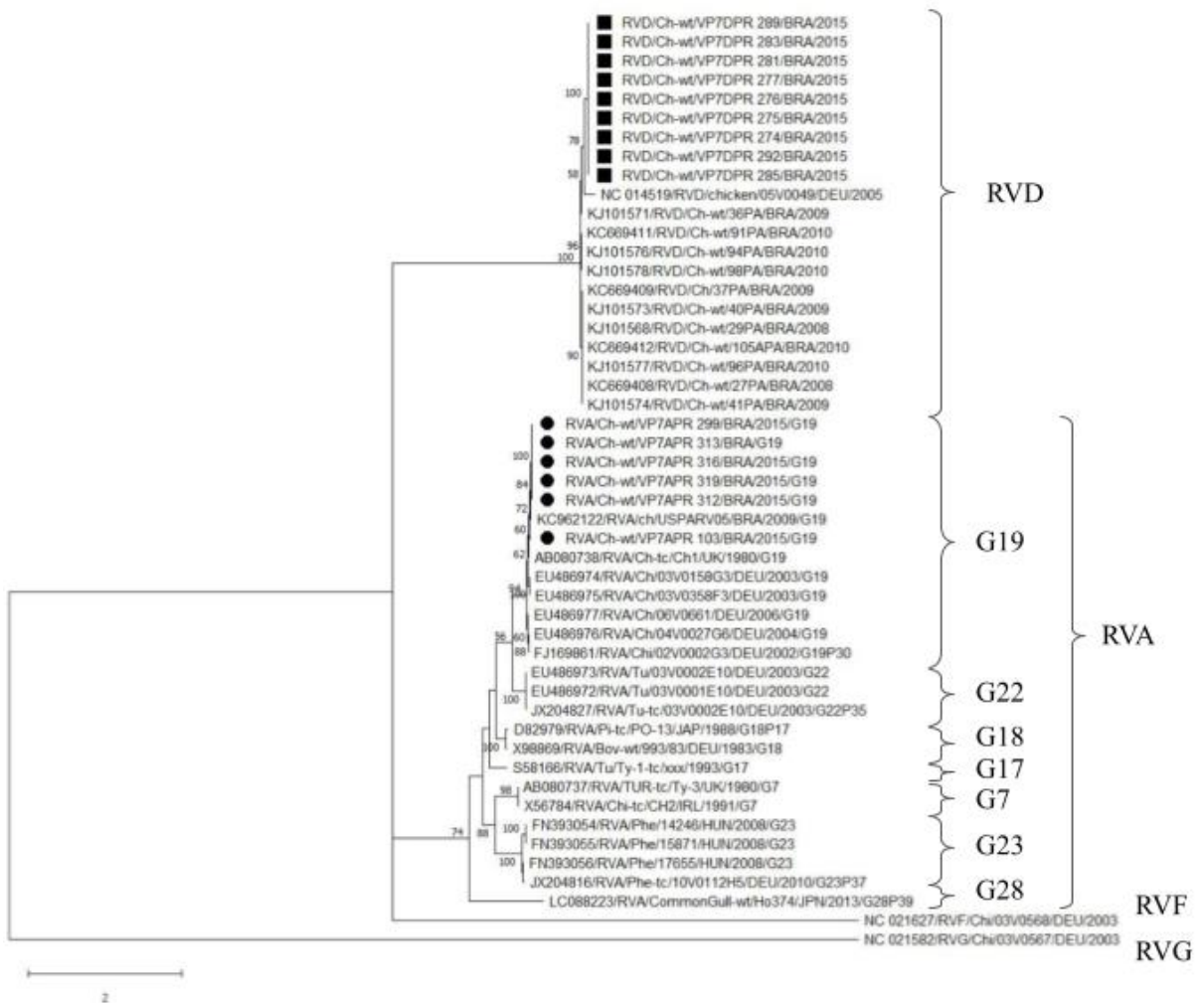


Table 1. Divergence of deduced amino acid (aa) sequences between rotavirus species A (RVA) strains from this study marked in bold and the prototype RVA 04V0027G6. The numbers above the sequences indicate the position of the aa in the VP7 protein, dots indicates a similar aa sequence to the prototype RVA strain.

	Amino acid position																	
	1	1	1	2	4	4	4	5	6	7	7	0	3	4	0	2	2	2
Avian rotavirus strains	8	9	0	0	4	7	2	8	0	5	3	5	9	8	3	4	5	
Prototype - EU486976/RVA/Ch/04V0027G6/DEU/2004/G19	I	I	V	V	A	V	H	I	V	A	Q	S	G	I	T	A	G	
● RVA/Chi-wt/VP7APR_103/BRA/2015/G19	.	V	.	I	T	I	Y	V	I	V	H	T	A	.	A	T	D	
● RVA/Chi-wt/VP7APR_299/BRA/2015/G19	.	V	I	.	T	.	Y	V	I	V	.	.	.	V	A	T	.	
● RVA/Chi-wt/VP7APR_312/BRA/2015/G19	Y	V	I	.	T	.	Y	V	I	V	.	.	.	V	A	T	.	
● RVA/Chi-wt/VP7APR_313/BRA/2015/G19	.	V	I	.	T	.	Y	V	I	V	.	.	.	V	A	T	.	
● RVA/Chi-wt/VP7APR_316/BRA/2015/G19	.	V	I	.	T	I	Y	V	I	V	.	.	.	V	A	T	.	
● RVA/Chi-wt/VP7APR_319/BRA/2015/G19	.	V	I	.	T	I	Y	V	I	V	.	.	.	V	A	T	.	
KC962122/RVA/chi/USPARV05/BRA/2009/G19	.	V	.	I	T	I	Y	V	I	V	.	N	.	.	A	T	.	
AB080738/RVA/Chi-tc/Ch1/UK/1980/G19	.	.	.	I	.	I	.	.	I	V	A	T	D	
FJ169861/RVA/Chi/02V0002G3/DEU/2002/G19P[30]	.	.	.	I	.	I	.	.	V	
Prototype - EU486974/RVA/Ch/03V0158G3/DEU/2003/G19	.	.	.	I	.	.	.	V	I	V	A	T	.	
Prototype - EU486975/RVA/Ch/03V0358F3/DEU/2003/G19	.	.	.	I	.	.	.	V	I	V	A	T	.	
Prototype - EU486977/RVA/Ch/06V0661/DEU/2006/G19	I	.	.	I	
KU372604/RVA/Chi/NIE11_A_361/NIG/2011/G19	-	-	-	-	-	-	-	.	V	V	A	.	.	
KU372605/RVA/Chi/NIE13_A_1107/NIE/2013/G19	-	-	-	-	-	-	-	.	V	I	D
KU372594/RVA/Chi/NIE11_A_250/NIG/2011/G19	-	-	-	-	-	-	-	.	V	I	V	A	T	.
KU372593/RVA/Chi/NIE11_A_432/NIG/2011/G19	-	-	-	-	-	-	-	.	V	I	V	A	T	.
KU372600/RVA/Guinea Fowl/NIE13_A_1094/NIE/2013/G19	-	-	-	-	-	-	-	.	V	T	V	A	T	.

BRA: Brasil; DEU: Alemanha; UK: Reino Unido; NIG: Nigeria; NIE: Nigeria; Ch: chicken; wt: wild type; tc: tissue culture

Table 3. Distribution of rotavirus species A by the 14 G genotypes detected across various avian species. Each black circle indicates a study that the G genotype was reported worldwide and each black square indicates a study from Brazil that reported the G genotype. The reported G genotype from this study was marked with white triangle.

Avian species	Genotype G (VP7 gene)													
	1	3	5	6	7	8	10	11	17	18	19	22	23	28
Broiler Chick			■		●	■ ⁴		■ ⁴		● ²	● ¹ ● ² ●●			
					● ¹						● ■ ⁴ ■△			
Duck										●				
Guinea Fowl											● ²			
Layer Chick			■ ⁴			■ ⁴					■ ⁴			
Ostriches							■							
Pheasant											● ²		●●	
Pigeon										● ● ²	● ²			
Turkey				■	● ³				● ● ³				● ¹	

Wild birds



*Adapted to Martella *et al.* (2010). Studies with more than one detection by genotype and/or host species: ¹ Schumann *et al.*, 2009; ² Pauly *et al.*, 2017; ³ Fujii *et al.*, 2016; ⁴Beserra *et al.*, 2014; ⁵Duarte *et al.*, 2020.

5 CONCLUSÕES

- Nas 55 amostras individuais de conteúdo entérico provenientes da coleção de amostras de excretas de pintainhos de frangos de corte com diarreia, foi possível determinar a presença de RVA, RVD e RVF em 10, 17 e 28 amostras por meio da amplificação parcial do gene VP6.
- Não foi identificada infecção mista com duas ou mais espécies de RV nas amostras individuais analisadas por meio da amplificação parcial do gene VP6.
- Com relação ao gene VP6 (genotipo I) as 10 cepas de RVA amostradas foram classificadas como I11 apresentando 92 a 97% de identidade de nt com outras cepas de RVA identificadas no Brasil e no mundo.
- Com relação ao gene VP6 as 12 cepas de RVD demonstraram 89% de identidade de nt com outras cepas de RVD previamente descritas no Brasil e no mundo.
- As 11 cepas de RVF demonstraram 93 a 98% de identidade de nt com outras sequências de RVF gene VP6 do Brasil.
- Das sete amostras de RVA analisadas, em seis delas foi possível determinar o genotipo G19 (gene VP7) com 95 a 97% de identidade nt com outras sequências do Brasil.
- Em nove das 12 cepas de RVD amostradas, o gene VP7 apresentou 89 a 91% de identidade nt com outras cepas do Brasil e 85% quando comparada à cepa protótipo 05V0049 descrita na Alemanha.

6 PERSPECTIVAS

Estudos adicionais e complementares são necessários para aperfeiçoar o conhecimento e os padrões de distribuição e patogenicidade das quatro espécies de RV aviário, bem como aspectos epidemiológicos da infecção, como a coinfeção por mais de uma espécie de RV aviário em um mesmo indivíduo e a frequência com que esse tipo de infecção ocorre em animais de produção com rápido ciclo de vida como frangos de corte.

Possíveis rotas de infecção interespecies com animais silvestres também devem ser exploradas através da captura e coleta de excretas de aves migratórias em áreas de preservação ambiental próximas a ambientes produtivos.

Embora em nosso estudo RV não tenha apresentado indícios transfronteiriços entre outras espécies, a potencial ocorrência deve continuar a ser monitorada, principalmente em animais de produção.

O estudo de *primers* e o uso de outras tecnologias de sequenciamento devem ser estimulados para maior cobertura das sequências de RV aviários, principalmente das espécies não-A.

Estudos mais abrangentes de metagenômica relacionados à síndrome da má absorção devem ser utilizados para esclarecer os padrões das populações virais, bacterianas e fúngicas na microbiota intestinal em aves com e sem sinais clínicos.

Adicionalmente, é necessário maior compreensão das principais vias de contaminação do ambiente produtivo pelo RV aviário, levando em consideração o comportamento natural da espécie animal que facilita a rota de infecção fecal-oral.

APÉNDICE

APÊNDICE A - INFORME TÉCNICO

Rotavirose aviária – o inimigo invisível da produção

O vírus mundialmente conhecido por promover diarreia na produção de suínos e bovinos, pode também estar presente no seu aviário, e ser a causa de perdas econômicas consideráveis. O agronegócio avícola do Brasil está entre os mais produtivos do mundo, mantendo o país como maior exportador de carne de aves desde 2004. A região sul se destaca principalmente pela produção no estado do Paraná, responsável por 35,54% da produção nacional, segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) no seu relatório anual de 2022. Inserido na região oeste do estado, encontramos o município de (NOME) que é o segundo maior do estado em concentração de aves. Essa alta densidade produtiva gera renda e empregos diretos e indiretos para suprir as demandas de produção

A integradora (NOME) é destaque internacional na produção de frangos de corte, e para que seja possível manter as demandas produtivas, reconhece que é necessário priorizar as questões sanitárias. Médicos veterinários que atuam na sanidade avícola entendem que os desafios sanitários consequentes da produção intensiva, que favorecem a ocorrência de enfermidades economicamente significativas.

O caminho para vencer o inimigo é estudar as suas características para entender os pontos de intervenção sanitária capazes de reduzir a presença de rotavírus (RV) no ambiente produtivo. Para tanto, os médicos veterinários da sanidade avícola: (NOMES) firmaram parceria com a UFPR – Setor Palotina através da Doutora Elisabete Takiuchi, Professora responsável pelo Laboratório de Virologia Animal.

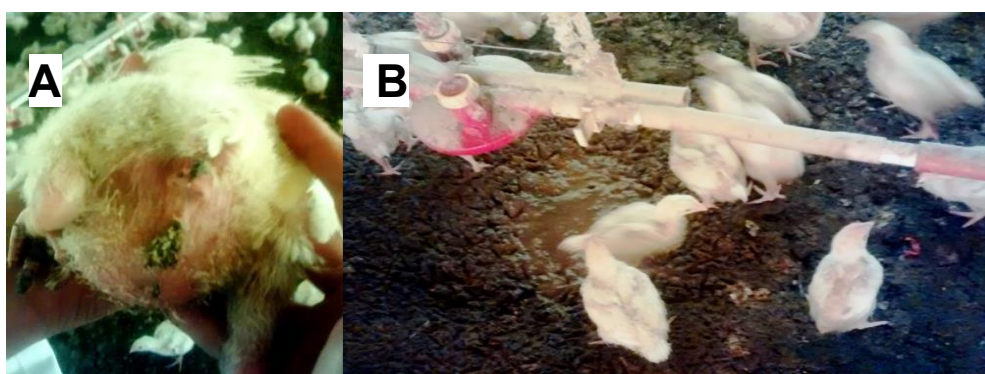
A pesquisa iniciou em meados de 2015 para verificar através de coletas estruturadas segundo o índice de eficiência produtiva (IEP) dos lotes, se RV estava circulando nos aviários da região no período de 2015-2017. E como a pesquisa não tem fronteiras, parte das análises e do trabalho da equipe de pesquisa acontece sob orientação do Professor Doutor Amauri A. Alfieri da Universidade Estadual de Londrina no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva no Laboratório de Virologia Animal que há 40 anos pesquisa vírus de interesse médico veterinário e atende demandas de diagnóstico das produções animais do estado e do Brasil.

Dentre as doenças que podem acometer as aves de produção, as doenças entéricas e respiratórias, que normalmente surgem nas duas primeiras semanas de idade da ave, são as que mais contribuem para a queda no desempenho produtivo, rendimento de carcaça e nas consequentes implicações econômicas. Dentre os patógenos entéricos que podem estar envolvidos a fama da *Salmonella* spp. e a *Eimeria* spp. ofuscam o atual inimigo invisível da produção: RV aviário.

Mundialmente, RV aviário, junto a outros patógenos virais tais como reovírus, parvovírus aviário e astrovírus, têm sido associados como potencial causadores ou cofatores da *Runting-Stunting Syndrome* (RSS) ou Síndrome da Má absorção (SMA). A SMA é caracterizada por deficiência no crescimento, desenvolvimento retardado das penas e sinais clínicos de enterite como diarreia, depressão e anorexia. Consequentemente, a SMA leva à desuniformidade do lote, aumento dos índices de refugagem e mortalidade, ocasionando constantes perdas econômicas na produção.

O índice de eficiência produtiva (IEP) é o principal indicador para mensurar o desempenho zootécnico de um lote de frangos de corte, e utiliza os parâmetros de ganho de peso diário (kg), viabilidade (%) e conversão alimentar para determinar a eficiência produtiva. Nessa pesquisa foram selecionados 12 aviários de acordo com o IEP e classificados de acordo com o manejo (bom, regular e ruim). Em cada lote aviário foram coletadas 20 a 22 aves refugos do manejo de descarte semanal. Essas aves coletadas apresentavam sinais clínicos indicativos da SMA, como tamanho reduzido, prostração, cloaca com excretas aderidas (Figura 1) e penas eriçadas. As aves foram eutanasiadas para coleta de porções do intestino delgado (local da infecção e replicação de RV), conteúdo intestinal e cama de aviário.

Figura 1: A: Pintainho com excretas aderidas na cloaca, característico da síndrome da má absorção. B: Ambiente propício para a permanência de rotavírus.



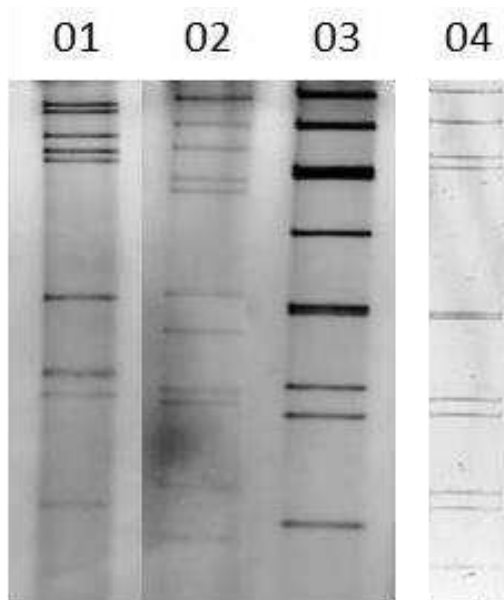
Fonte: a autora

No Laboratório de Virologia Animal da UFPR – Setor Palotina, as amostras foram devidamente armazenadas e refrigeradas para seguir um protocolo eficiente para detecção de RV nas excretas das aves, já que o tamanho da partícula viral é de 100 nanômetros, impossível de se visualizar em um microscópio comum. Então como detectar um inimigo menor que uma agulha em um aviário?

Duas características muito peculiares do RV é o seu genoma segmentado, semelhante ao vírus da gripe aviária, e a alta concentração de partículas virais nas excretas de aves infectadas (chegando a 10^{10} partículas virais em um grama de excreta). Essas duas características permitem empregar uma técnica laboratorial chamada eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) que apesar de laboriosa, permite identificar as espécies de RV que estão presentes no plantel sem a necessidade de outras técnicas de diagnóstico como a amplificação do material genético pela PCR (reação em cadeia pela polimerase) já utilizado para outros patógenos, porém mais caro para execução.

A técnica de EGPA exige uma preparação prévia das amostras colhidas a campo. Basicamente são realizadas lavagens sucessivas com reagentes desnaturantes para que o material genético do vírus seja exposto. Posteriormente, as amostras já processadas são aplicadas em um gel de poliacrilamida para que junto a uma corrente de voltagem e amperagem possa separar os segmentos do genoma de acordo com o seu tamanho molecular. E o que é visualizado após uma impregnação com nitrato de prata são os chamados perfis eletroforéticos de RV, e classificamos de acordo com a distribuição das bandas a qual espécie pertence (eletroferogrupo) (Figura 2).

Figura 2: Perfil de migração dos segmentos de RNA das espécies de rotavírus aviário A (01), D (02), F (03) e G*(04) em gel de poliacrilamida impregnado com nitrato de prata, identificados nos aviários deste estudo. *Espécie G de RV não identificada nesta pesquisa (OTTO *et al.*, 2012).

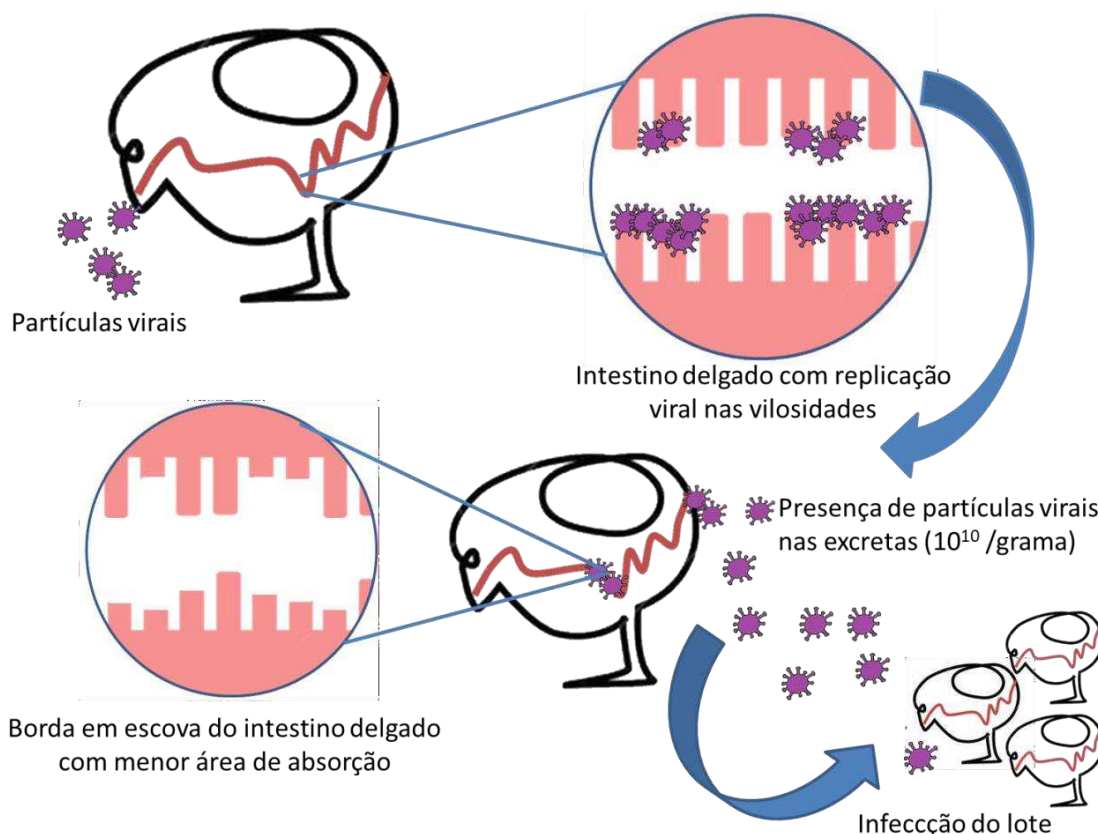


Fonte: a autora

Nosso estudo comparou as taxas de detecção de RV nos aviários de acordo com os IEP, e a taxa de detecção de RV em lotes com manejo ruim é significativamente maior quando comparada à detecção de RV em lotes com manejo bom.

Para o produtor e o médico veterinário sanitariano o importante é saber se RV está presente e em quais proporções. Por exemplo, o seguinte cenário: em uma coleta amostral RV foi detectado na EGPA, significa que está acontecendo uma infecção com altos níveis de excreção viral, ou seja, aves com lesões entéricas devido à replicação viral nos enterócitos apicais das vilosidades do intestino delgado, e que com certeza apresentarão uma maior taxa de conversão alimentar (Figura 3).

Figura 3: Ciclo replicativo de rotavírus aviário mostrando a infecção dos enterócitos apicais, seguida de alta excreção de partículas virais e posterior lesão com redução da área de absorção do tecido epitelial no intestino delgado.



Fonte: a autora

Além disso, podemos identificar mais de uma espécie de RV presente em um mesmo lote aviário, o que pode indicar uma infecção entre lotes, consequência de um manejo irregular do vazio sanitário. Também pode ocorrer a detecção de mais de uma espécie de RV em uma mesma ave, agravando o quadro de enterite e o desenvolvimento do pintainho. E tudo isso pode acontecer ao mesmo tempo, em um mesmo lote, como já foi verificado no estudo realizado, e em outros estudos recentes conduzidos em outros países.

Diante desse cenário, diferente do que ocorre nas produções de suínos e bovinos, o uso de vacinas ou medicamentos viriostáticos ainda não é realidade na avicultura para o controle de RV. Porém, o grupo de pesquisa afirma: não é necessário que sigamos os mesmos passos, a avicultura é muito distinta dessas outras produções quando entendemos a forma de transmissão de RV. A cama de

aviário tem uma relevância epidemiológica e sanitária quando comparada a outros substratos utilizados na produção animal. Isso é explicado pelo modo de alimentação das aves que ao ciscarem ingerem partículas de cama de aviário e conseqüentemente realizam a inoculação inicial da microbiota gastrointestinal.

Outra característica do manejo de cama de aviário é o seu reuso entre lotes para reduzir custos de produção e melhor desenvolvimento da microbiota do sistema gastrointestinal das aves de produção. No entanto, as normas técnicas para o manejo de reuso no processo de limpeza e desinfecção da cama de aviário são genéricas e geralmente dependem de escolhas do responsável pelo manejo do aviário com critérios pouco claros. Dentre as técnicas de reuso de cama de aviário está o enleiramento com fermentação, adição de cal, acidificantes, materiais alcalinos, absorventes, inibidores, agentes antimicrobianos e tratamentos enzimáticos. O uso de glutaraldeído ou hipoclorito de sódio (em concentrações específicas) como agente desinfetante após a limpeza, tem a capacidade de inativar RV.

O que a nossa pesquisa mostra de forma bem clara é: RV está circulando e está relacionado principalmente com a qualidade de manejo sanitário realizado, e a parceria entre a pesquisa e a produção é crucial para compreender a epidemiologia, disseminação e evolução de RV no ambiente produtivo para um melhor uso dos recursos e a mitigação dos desafios sanitários.

ANEXOS

ANEXO A - LISTA DE REAGENTES

1. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
2. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
3. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab[®])
4. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
5. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
6. Agarose (Invitrogen[™] Life Technologies)
7. Água DEPC (Diethyl pirocarbonato) (Invitrogen Life Technologies[®])
8. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
9. Álcool isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) P.M. 88,15 (Synth[®])
10. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems[®])
11. Brometo de etídio ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
12. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (Invitrogen[™] Life Technologies)
13. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies[®])
14. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
15. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
16. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
17. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
18. DNA Ladder (100 pb) (Invitrogen Life Technologies[™])
19. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μL ; 25 μmol cada (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[™])
20. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (Invitrogen Life Technologies[™])
21. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 94,11 (Invitrogen Life Technologies[™])
22. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
23. Fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 177,99 (Merck[®])
24. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
25. Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) P.M. 180,16 (Reagen[®])
26. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
27. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])

28. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL®)
29. Metanol P.A. (CH₃OH) P.M. 32,04 (*Allkimia*®)
30. PCR-*buffer* (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (*Invitrogen Life Technologies*™)
31. *Platinum Taq DNA Polymerase 500 units* (*Invitrogen Life Technologies*™)
32. *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (*Invitrogen Life Technologies*™)
33. *QuantIT™ dsDNA BR assay kit* (*Invitrogen Life Technologies*™)
34. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (*Reagen*®)
35. Triton x-100 (*Synth*®)

ANEXO B - SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **Fenol/clorofórmio/álcool isoamílico**
 - 25 mL de fenol saturado em água
 - 24 mL de clorofórmio
 - 1 mL de álcool isoamílico

- **Gel de agarose 2%**
 - 1 g de agarose
 - 50 mL de tampão TBE 1x
 - 25 µL de brometo de etídio

- **Hidratação da sílica**
 - 6 g de sílica
 - Adicionar 500 mL de água ultrapura autoclavada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Ajustar o pH (pH 2,0)
 - Aliquotar

- **SDS 10%**
 - 5 g de dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
 - Água bidestilada q.s.p. 50 mL

- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
 - 2,6 mL de Triton 100x

- **Solução L2**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**
 - Azul de bromofenol 0,25%
 - Sacarose – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 45%
 - Água bidestilada q.s.p. 100 mL

- **Tampão de corrida – Tris – Ácido bórico – EDTA 10x**

- 108 g Tris
- 55 g Ácido bórico
- 9,55 g EDTA
- Água bidestilada q.s.p. 1 litro
- Ajustar o pH (pH 8,4)

- **Tampão Tris Cálcio 10x**

- 12,12 g Tris
- 2,2 g Cloreto de Cálcio (CaCl_2)
- Água ultrapura autoclavada q.s.p. 1000 mL
- Ajustar o pH (pH 7,4)

ANEXO C - SEQUÊNCIAS DE PRIMERS

Gene	Primer	Sequência 5' → 3'	Referência
VP6 A	RotAseg6s	GTCTTCATCATGGATGTA	Schumann <i>et al.</i> , 2009
	RotAseg6as	AATCTCTACTTAATGACCATG	
VP6 D	RD6F	GGAGGCGCTGTCTTCAATTGCG	Bezerra <i>et al.</i> , 2012
	RD6R	TGGCCAATAGTGTGTGGCAGCT	
VP6 F	RF6F	ACTATAGCCGATGCGGAGGA	Mascarenhas <i>et al.</i> , 2016
	RF6R	TTGTGATAGCACCGCTGGTC	
VP6 G	RG6F	CTCCAACCTAGCTTTCAGCA	Mascarenhas <i>et al.</i> , 2016
	RG6R	TGGAATGTTCCGGATCCACC	
VP7 A	VP7AVEFW mod	TGTATAGTACTGARTGTACTADCYT T	Beserra <i>et al.</i> , 2014
	VP7ANYR W	TGCCACCAYYTYTTCC	
VP7 D	RD9F	ACCATATAGGAGTGACGCACCT	Bezerra <i>et al.</i> , 2014
	RD9R	AGCCCACCACTTCTTCCAAT	

ANEXO D - DILUIÇÃO DE *PRIMERS*RT-PCR I (VP6A)

Primer RotAseg6s

Concentração: 50,4 nm

Data de fabricação: janeiro 2019

$50,4 \times 1000 = 50400$ pmol

$50400 / 200 = 252$ μ L água ultrapura

Primer RotAseg6as

Concentração: 58,0 nm

Data de fabricação: janeiro 2019

$58,0 \times 1000 = 58000$ pmol

$58000 / 200 = 290$ μ L água ultrapura

RT-PCR (VP6D)

Primer RD6F

Concentração: 116,4 nm

Data de fabricação: julho 2016

$116,4 \times 1000 = 116400$ pmol

$116400 / 200 = 582$ μ L água ultra-pura

Primer RD6R

Concentração: 69,6 nm

Data de fabricação: janeiro 2019

$69,6 \times 1000 = 69000$ pmol

$69600 / 200 = 348$ μ L água ultra-pura

RT-PCR (VP6F)

Primer RF6F

Concentração: 41,6 nm

Data de fabricação: outubro 2017

$41,6 \times 1000 = 41600$ pmol

$41600 / 200 = 208$ μ L água ultra-pura

Primer RF6R

Concentração: 48,6 nm

Data de fabricação: outubro 2017

$48,6 \times 1000 = 486000$ pmol

$48600 / 200 = 243$ μ L água ultra-pura

RT-PCR (VP6G)

Primer RG6F

Concentração: 45,1 nm

Data de fabricação: outubro 2017
 $45,1 \times 1000 = 45100 \text{ pmol}$
 $45100 / 200 = 225,5 \text{ } \mu\text{L}$ água ultrapura

Primer RG6R

Concentração: 49,1 nm
 Data de fabricação: outubro 2017
 $49,1 \times 1000 = 49100 \text{ pmol}$
 $49100 / 200 = 245,5 \text{ } \mu\text{L}$ água ultrapura

RT-PCR G (VP7A)

Primer VP7AVEFWmod

Concentração: 47,8 nm
 Data de fabricação: janeiro 2019
 $47,8 \times 1000 = 47800 \text{ pmol}$
 $47800 / 200 = 239 \text{ } \mu\text{L}$ água ultrapura

Primer VP7ANYRW

Concentração: 64,3 nm
 Data de fabricação: janeiro 2019
 $64,3 \times 1000 = 64300 \text{ pmol}$
 $64300 / 200 = 321,5 \text{ } \mu\text{L}$ água ultrapura

RT-PCR (VP7D)

Primer RD9F

Concentração: 52,1 nm
 Data de fabricação: janeiro 2019
 $52,1 \times 1000 = 52100 \text{ pmol}$
 $52100 / 200 = 260,5 \text{ } \mu\text{L}$ água ultrapura

Primer RD9R

Concentração: 54,7 nm
 Data de fabricação: janeiro 2019
 $54,7 \times 1000 = 54700 \text{ pmol}$
 $54700 / 200 = 273,5 \text{ } \mu\text{L}$ água ultrapura

Solução estoque de todos os primers: ressuspender em água ultrapura para obtenção de solução 10x []

Solução de uso de todos os primers: diluir 1:10 a solução estoque em água ultrapura
 Concentração final: 20 pmol / μL

Diluição de dNTP

Solução estoque (100 mM) – 100 μL de cada dNTP (dNTPA, dNTPC, dNTPG, dNTPT)
 Solução uso (10 mM) – 10 μL da solução estoque + 90 μL de água ultrapura autoclavada

ANEXO E - PROTOCOLO DE TÉCNICAS

Extração do ácido nucleico pela associação das técnicas fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico e sílica/ isotiocianato de guanidina

Suspensão fecal – extração bruta

- 100 µL ou 100 mg de excretas
- 500 µL de Tampão Tris/Cálcio
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 5.000 x g/10 min
- Utilizar 500 µL do sobrenadante para extração

Extração do ácido nucleico

Fase I

- 500 µL da suspensão da amostra de conteúdo entérico
- 500 µL de tampão Tris-Cálcio
- Adicionar 50 µL de SDS 10%
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/30 min
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Utilizar todo o volume para a extração do ácido nucleico

Fase II

- Adicionar 500 µL da solução L6
- Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- Agitar em temperatura ambiente /30 min
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1 mL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em vórtex

- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1 mL de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g/30 s
- Desprezar sobrenadante
- Secar o pellet em termo bloco a 60 °C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria a 56 °C (15 min)
- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C/15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 13.000 x g/4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
- Estocar à -20 °C até a utilização

Transcrição reversa (RT-PCR)

Mix desnaturação *singleplex*

<i>Mix desnaturação VP6 A</i>
<i>Primer forward</i> Rota-Seg6-s (20 pmol) - 0,5 µL <i>Primer reverse</i> Rota-Seg6-as (20 pmol) - 0,5 µL RNA - 3 µL
Volume final - 4 µL

<i>Mix desnaturação VP6 D</i>
<i>Primer forward</i> RD6F(20 pmol) - 0,5 µL <i>Primer reverse</i> RD6R (20 pmol) - 0,5 µL RNA - 3 µL
Volume final - 4 µL

<i>Mix desnaturação VP6 F</i>
<i>Primer forward</i> RF6F (20 pmol) - 0,5 µL

Primer reverse RF6R (20 pmol) - 0,5 µL

RNA - 3 µL

Volume final - 4 µL

Mix desnaturação VP6 G

Primer forward RG6F(20 pmol) - 0,5 µL

Primer reverse RG6R (20 pmol) - 0,5 µL

RNA - 3 µL

Volume final - 4 µL

Mix desnaturação VP7 A

Primer forward VP7AVEFW (20 pmol) - 0,5 µL

Primer reverse VP7ANYRW (20 pmol) - 0,5 µL

RNA - 7 µL

Volume final - 8 µL

Mix desnaturação VP7 D

Primer forward RD9F (20 pmol) - 0,5 µL

Primer reverse RD9R(20 pmol) - 0,5 µL

RNA - 3 µL

Volume final - 4 µL

Mix* transcrição reversa (RT-MIX) *singleplex

Mix RT-PCR VP6 A, D, F e G

Tampão 10x pH 8,4 - 2,5 µL

MgCl₂ 50 mM - 0,75 µL

dNTP 10 mM - 1 μ L Água ultrapura - 16,5 μ L <i>Superscript II</i> [®] 200U/ μ L - 0,25 μ L Produto da desnaturação - 4 μ L

Volume final - 25 μ L

<i>Mix RT-PCR VP7 A</i>

Tampão 10x pH 8,4 - 5 μ L MgCl ₂ 50 mM - 1,5 μ L dNTP 10 mM - 2 μ L Água ultrapura - 3 μ L <i>Superscript II</i> [®] 200U/ μ L - 0,5 μ L Produto da desnaturação - 8 μ L

Volume final - 20 μ L

<i>Mix RT-PCR VP7 D</i>

Tampão 10x pH 8,4 - 2,5 μ L MgCl ₂ 50 mM - 2,5 μ L dNTP 10 mM - 1 μ L Água ultrapura - 15,5 μ L <i>Primer forward</i> RD9F(20 pmol) - 0,5 μ L <i>Primer reverse</i> RD9F(20 pmol) - 0,5 μ L <i>Superscript II</i> [®] 200U/ μ l - 0,25 μ L Produto da desnaturação - 4 μ L

Volume final - 25 μ L

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

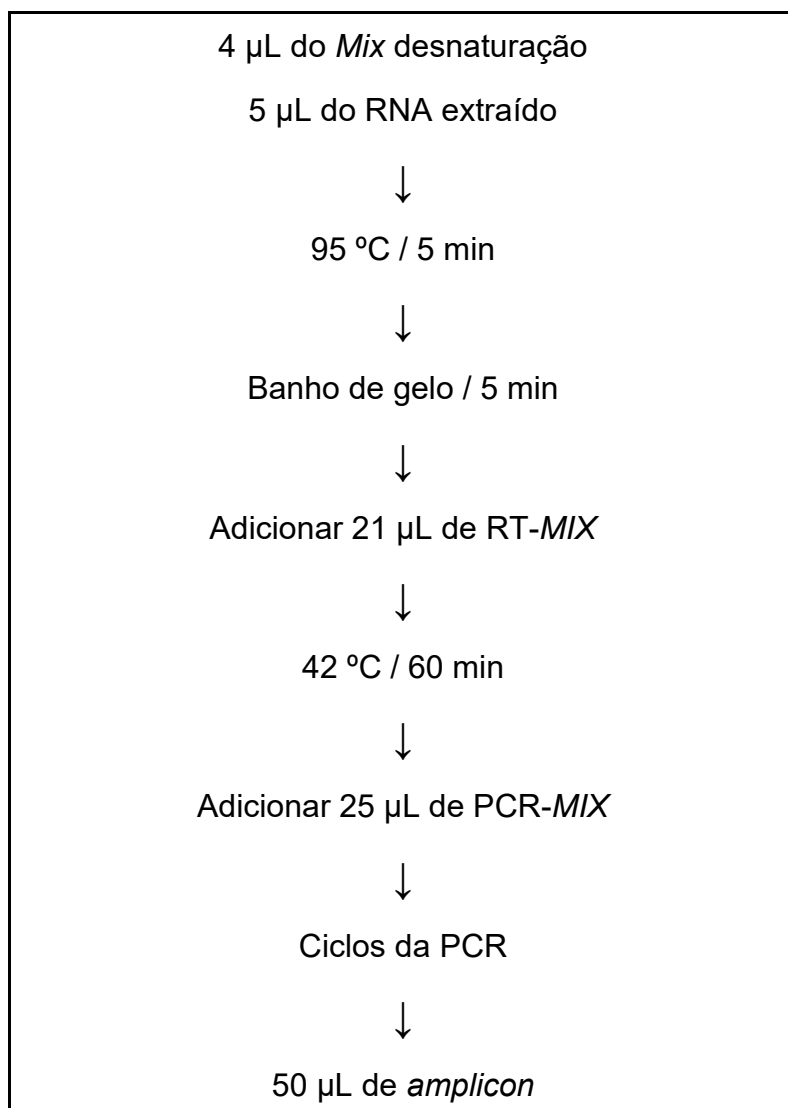
Mix da reação em cadeia da polimerase (PCR-MIX) - singleplex

<i>Mix PCR VP6 A, D, F e G</i>
Tampão 10x pH 8,4 - 2,5 µL MgCl ₂ 50 mM - 0,75 µL dNTP 10 mM - 3 µL Água ultrapura - 18,5 µL <i>Platinum Taq</i> [®] 200U/µL - 0,25 µL cDNA - 25 µL
Volume final - 50 µL

<i>Mix PCR VP7 A</i>
Tampão 10x pH 8,4 - 2,5 µL MgCl ₂ 50 mM - 0,75 µL dNTP 10 mM - 2 µL Água ultrapura - 14,5 µL <i>Platinum Taq</i> [®] 200U/µl - 0,25 µL cDNA - 25 µL
Volume final - 50 µL

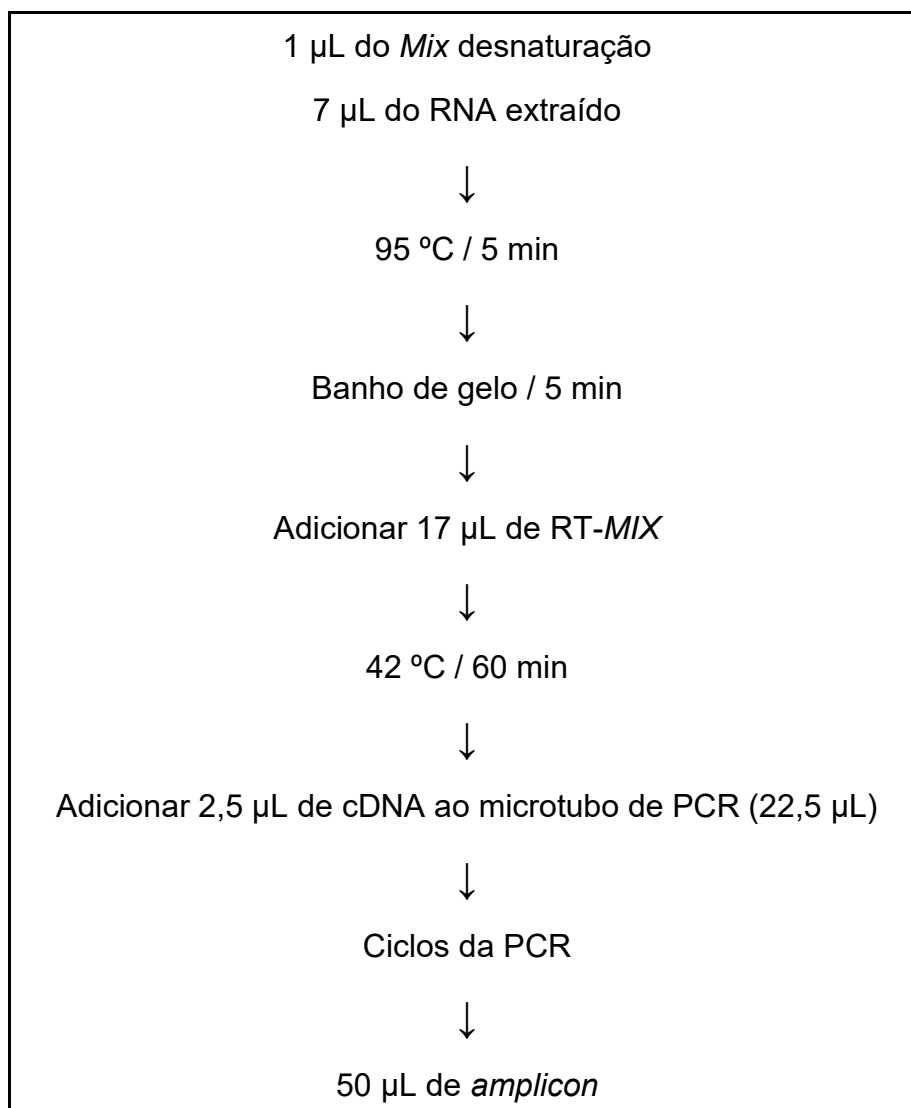
<i>Mix PCR VP7 D</i>
Tampão 10x pH 8,4 - 2,5 µL MgCl ₂ 50 mM - 0,75 µL dNTP 10 mM - 3 µL Água ultrapura - 18,5 µL <i>Platinum Taq</i> [®] 200U/µl - 0,25 µL cDNA - 25 µL
Volume final - 50 µL

ESQUEMA DA RT-PCR PARA VP6 A, D, F e G - *singleplex*

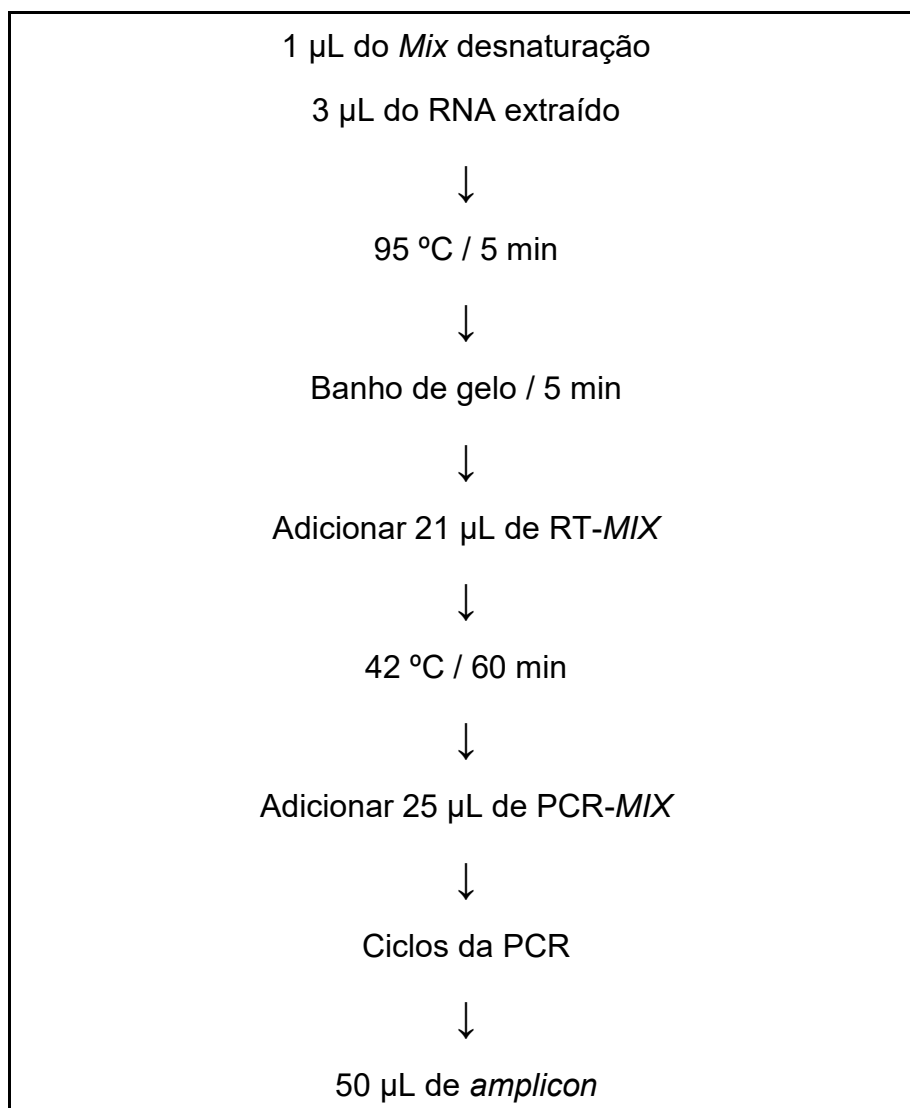


Etapas da PCR para o gene alvo VP6 das espécies A, D, F e G de rotavírus

Ciclos	VP6 A, D, F e G
Desnaturação inicial	94 °C / 3 min
Desnaturação	94 °C / 1 min
Anelamento	55 °C / 1 min
Extensão	72 °C / 1 min
Nº de ciclos térmicos	35
Extensão final	68 °C / 7 min

ESQUEMA DA RT-PCR PARA VP7 A**Etapas da PCR para o gene alvo VP7 espécie A de rotavírus**

Ciclos	VP7 A
Desnaturação inicial	94 °C / 3 min
Desnaturação	94 °C / 30 s
Anelamento	50 °C / 45 s
Extensão	72 °C / 45 s
Nº de ciclos térmicos	30
Extensão final	72 °C / 10 min

ESQUEMA DA RT-PCR PARA VP7 D

Etapas da PCR para o gene alvo VP7 espécie D	
Ciclos	VP7 A
Desnaturação inicial	93 °C / 3 min
Desnaturação	93 °C / 1 min
Anelamento	55 °C / 1 min
Extensão	72 °C / 1 min
Nº de ciclos térmicos	35
Extensão final	68 °C / 7 min

Eletroforese em gel de agarose a 2%

- 5 μ L do *amplicon*

- 1 μ L de tampão de amostra

Corrida eletroforética sob voltagem (100 V) e amperagem (80 A) constantes por aproximadamente 50 min.

Purificação de produto de PCR excisado do gel

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.
2. Adicionar 3 volumes do tampão de solubilização em gel (L3) para cada 1 volume de gel.
3. Incubar o tubo a 50 °C/15 min, homogeneizando a cada 3 min.
4. Transferir o gel dissolvido com o amplificado de interesse para um tubo coletor com coluna.
5. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
6. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
7. Adicionar 500 μ L do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.
8. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
9. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
10. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
11. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
12. Adicionar 30 μ L do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
13. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
14. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
15. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20 °C.

Purificação direta de produto de PCR

1. Adicionar 4 volumes do *Binding buffer* (B2) a 1 volume de reação de PCR.
2. Transferir a solução para uma coluna de purificação.
3. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
4. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
5. Adicionar 650 μ L do *Wash buffer 1* (W1) na coluna com tubo coletor.

6. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
8. Centrifugar o tubo novamente à velocidade máxima por 3 min.
9. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
10. Adicionar 30 µL do *Elution buffer 1* (E1) no centro da coluna.
11. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
12. Centrifugar a 13.000 x g/1 min.
13. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20 °C

Quantificação de produto de PCR

1. Preparar a solução Quant-iT™ *Working Solution* diluindo o reagente Quant-iT™ em *Buffer* Quant-iT™ 1:200. São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
2. Homogeneizar em vórtex.
3. Microtubo das amostras: adicionar 198 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 2 µL do fragmento de DNA purificado.
4. Microtubo do padrão 0: adicionar 190 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 10 µL do padrão 0.
5. Microtubo do padrão 100: adicionar 190 µL da solução Quant-iT™ *Working Solution* em 10 µL do padrão 100.
6. Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2-3 s.
7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min.
8. Realizar a leitura usando *Qubit™ fluorometer* (*Invitrogen™ Life Technologies*, EUA).
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra.

Sequenciamento pelo método Sanger

Preparo de amostras para o sequenciamento

As amostras e os *primers* devem estar na concentração demonstrada na tabela abaixo:

Tamanho do fragmento (pares de base)	Concentração da amostra (ng/ μ L ou μ g/mL)	Concentração do <i>primer</i> (pmol/ μ L ou μ M)
< 300	2	5
300 – 700	4	5
>700	10	10

Mix do sequenciamento

Reagente*	Volume
<i>BigDye Terminator v3.1</i>	2,0 μ L
Tampão 5x	1,5 μ L
Água ultrapura autoclavada	0,5 μ L
Volume final	4,0 μ L

**BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*

O volume final de mix do sequenciamento é adicionado a 5 μ L de amostra purificada + 1 μ L de *primer*.

Ciclos de tempo e temperatura da reação de sequenciamento*

Reação	Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação inicial	96	1 min	1
Desnaturação	96	15 seg	35
Anelamento	50	15 seg	35
Extensão	60	4 min	35

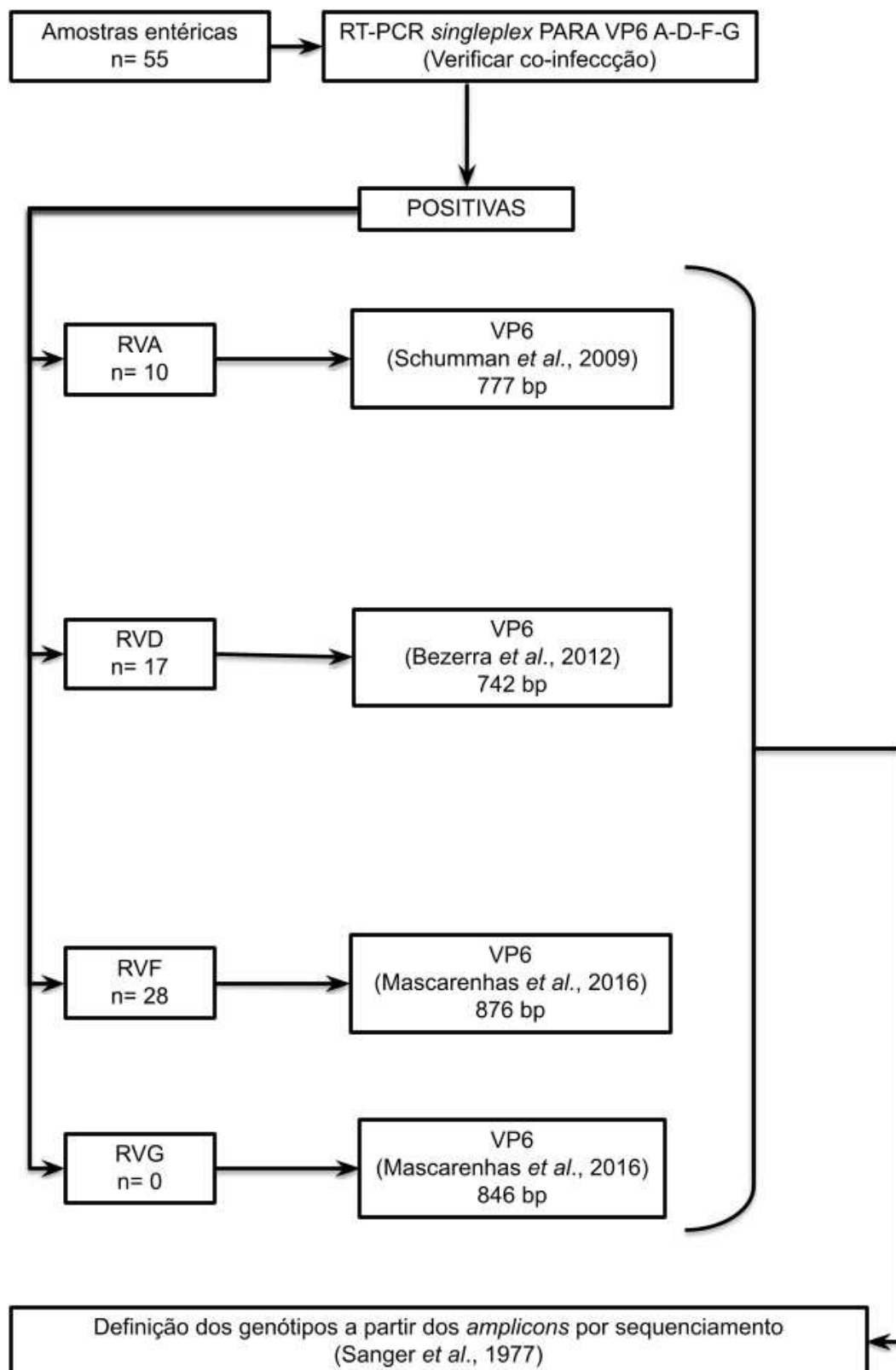
*Programa recomendado pela *Applied Biosystems*.

Precipitação com EDTA e Etanol

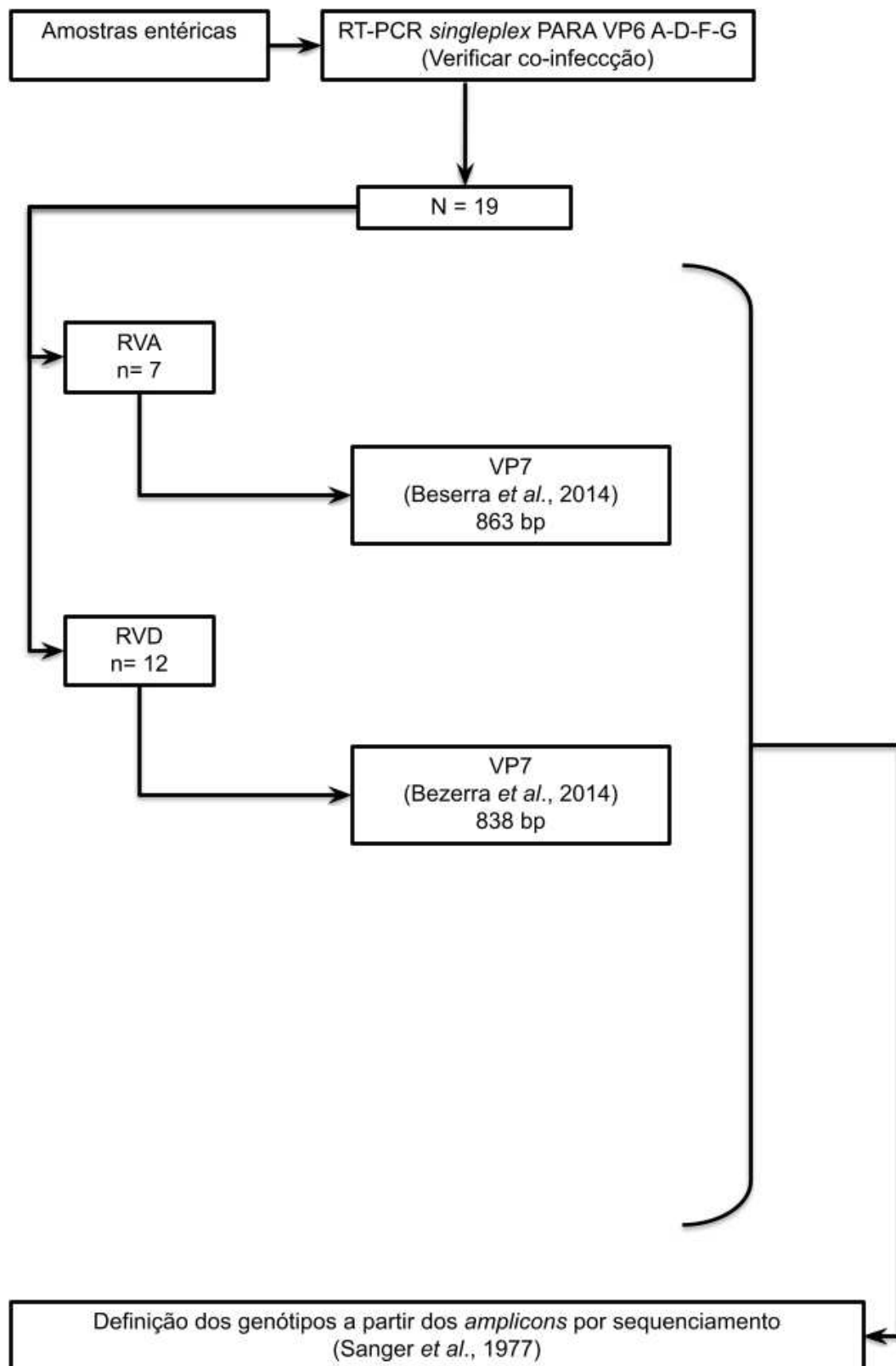
- Adicionar 10 μ L da reação de sequenciamento em uma cavidade da placa *MicroAmp[®] Optical 96-Well Reaction* (0,2 mL) (Applied Biosystems).
- Adicionar 2,5 μ L de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 125 mM pH 8,0.
- Adicionar 30 μ L de etanol 100%.
- Homogeneizar lentamente a placa.
- Incubar a placa por 10 min em temperatura ambiente.
- Centrifugar a 2720 x g durante 30 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Adicionar 100 μ L de etanol 70%.
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C.
- Desprezar o conteúdo da placa.
- Centrifugar a 2720 x g durante 1 min a 20 °C com a placa invertida sobre papel.
- Cobrir a placa com papel e deixar em temperatura ambiente por 10 min.
- Adicionar 10 μ L de formamida (HIDI).
- Adicionar a septa.
- Homogeneizar a placa em vórtex.
- Submeter à placa a um *spin* no *miniplate spinner*.
- Colocar a placa em termociclador (tampa aberta) por 95 °C por 5 min.
- Colocar a placa em *cooler* ou banho de gelo por 1 min.
- Após a precipitação com EDTA e etanol, a placa é inserida no sequenciador (*ABI 3500 Genetic Analyzer - Applied Biosystems*) para realizar a eletroforese capilar.

ANEXO F - PIPELINE DO PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

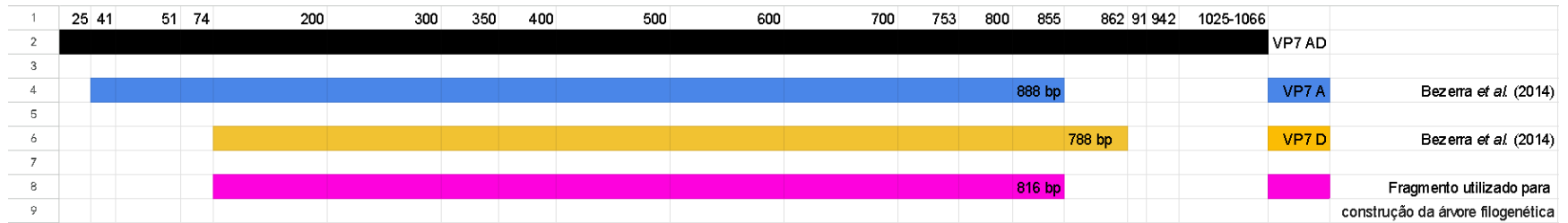
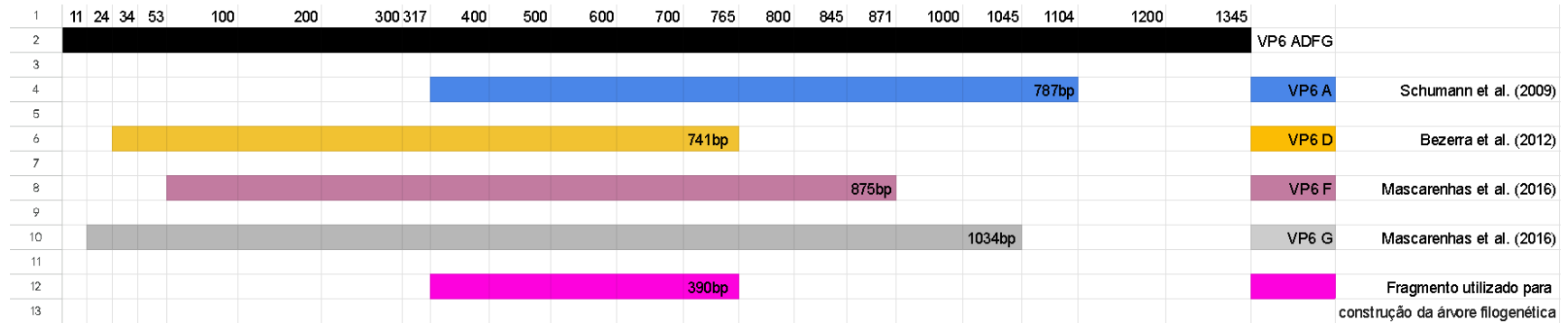
Sequência de atividades para processamento e caracterização das amostras de rotavírus aviário - Parte 1



Sequência de atividades para processamento e caracterização das amostras de rotavírus aviário - Parte 2



ANEXO G - TAMANHO E POSIÇÃO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS



ANEXO H - LISTA DE SOFTWARES

- *Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3*
<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>
- *The Basic Local Alignment Search Tool - BLAST*
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- *Virus Pathogen Database and Analysis Resource - VIPRBRC*
<http://www.viprbrc.org/>
- *Molecular Evolutionary Genetics Analysis - MEGA 6.0*
<https://www.megasoftware.net/>
- *Biological sequence alignment editor - BioEdit 7.2*
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
- *DNA sequence traces software - FinchTV 1.4*
www.geospiza.com/finchtv