

CARLA MENEGUIN BARBOSA

**CORONAVÍRUS EM AVES SILVESTRES E DOMÉSTICAS
PROVENIENTES DE DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós -
Graduação Interunidades em Biotecnologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título de Mestre
em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

Versão original.

São Paulo
2015

RESUMO

BARBOSA, C. M. **Coronavírus em aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões do Brasil**. 2015 f.62 Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Devido ao seu mecanismo único de replicação, os CoVs têm uma tendência a sofrer recombinações e mutações, o que permite que se adaptem constantemente a novos hospedeiros e nichos ecológicos (WOO et al., 2012), podendo inclusive passar a acometer o homem, a exemplo do ocorrido com os Coronavírus causadores da Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) (CHAN et al., 2013). Apesar de ainda não terem sido relatados Coronavírus aviários com potencial zoonótico, espécies de aves silvestres e domésticas podem portar CoVs de grande importância econômica como o Vírus da Bronquite Infecciosa (IBV) que causa lesões em trato gastrointestinal, respiratório, urinário e reprodutor, levando a taxas de mortalidade de cerca de 30% e quedas bruscas na produção de ovos (CAVANNAGH, 2007). Além disso, nos últimos anos, diversos novos CoVs geneticamente distintos do IBV vêm sendo identificados em diferentes famílias de aves e mamíferos silvestres e domésticos. O Brasil contém 18% do total da diversidade de espécies de aves no mundo (CBRO 2011; <http://www.cbro.org.br>) e o maior número de espécies ameaçadas de extinção (DEVELEY; GOERCK, 2009), no entanto, estudos sobre a presença de Coronavírus em aves silvestres ainda são bastante escassos. O presente estudo tem por objetivo realizar análise retrospectiva da presença de Coronavírus em swabs traqueais e cloacais de aves silvestres e domésticas provenientes de diferentes regiões brasileiras, coletadas entre os anos de 2004 e 2013; realizar a caracterização molecular dos vírus encontrados, através do sequenciamento parcial do gene da RNA polimerase RNA dependente (RpRd) nas amostras positivas e análise filogenética afim de correlacionar a epidemiologia dos vírus encontrados às rotas de migrações de aves e à proximidade das regiões urbanas e de granjas avícolas, verificando a possibilidade de transmissão. Para isso, as amostras foram submetidas a extração de RNA total seguida das reações de Transcrição Reversa (RT), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Nested-PCR, com primers que têm como alvo o gene da RpRd, e os resultados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose. As amostras positivas foram purificadas e sequenciadas. Uma vez que o gene da proteína S dos Coronavírus é bastante variável entre os diferentes grupos, somente as amostras que apresentaram *Gammacoronavírus* foram submetidas a protocolos similares com primers que têm como alvo regiões gene da proteína S do IBV. Do total de 746 amostras testadas, 25 apresentaram resultados positivos para

os Coronavírus na PCR e Nested-PCR com primers para o gene da RpRd e foram sequenciadas. Obtivemos sucesso no sequenciamento de 7 dessas amostras, sendo 4 positivas para *Gammacoronavírus* e 3 positivas para *Deltacoronavírus*. Na tentativa de sequenciamento da proteína S dos 4 *Gammacoronavírus* encontrados, obtivemos sucesso na amostra proveniente de uma galinha (*Gallus gallus*), coletada na Ilha de Marajó-PA. Essa amostra mostrou sequência sendo identificada como uma cepa de IBV próxima a cepas detectadas anteriormente no Brasil. Este trabalho é inédito no Brasil, pois demonstra a presença de *Gamma* e *Deltacoronavírus* aviários circulando em diversas regiões do país, próximo a regiões urbanas e de indústrias avícolas, mostrando evidências de que aves silvestres podem carrear estes Coronavírus entre diferentes sítios migratórios no Brasil.

Palavras-chave: Coronavírus. Aves silvestres. Aves domésticas. Aves migratórias. Biologia molecular. Brasil.

ABSTRACT

BARBOSA, C. M. **Coronavirus in wild and domestic birds from different regions of Brazil**. 2015 p. 62 Masters thesis (Biotechnology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Because of its unique replication mechanism, Coronaviruses (CoVs) tend to suffer recombinations and mutations, allowing them to constantly adapt to new hosts and ecological niches (Woo et al., 2012), and may even come to affect humans, like the Coronavirus causing Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) and the Middle East Respiratory Syndrome (MERS) (Chan et al., 2013). Regardless it has never been reported any avian Coronavirus with zoonotic potential, species of both wild and domestic birds can carry CoVs of great economic importance as the Infectious Bronchitis Virus (IBV) that causes lesions in the gastrointestinal, respiratory, urinary and reproductive systems, leading to mortality rates of around 30% and sudden drops in egg production (CAVANNAGH, 2007). Furthermore, recently, many new CoVs, genetically distinct from IBV have been identified in different families of wild and domestic birds and mammals. Even though Brazil contains 18% of the bird species diversity in the world (CBRO 2011; <http://www.cbro.org.br>) and the largest number of endangered species (DEVELEY; Goerck, 2009), studies about the presence of Coronaviruses in wild birds are still quite scarce. This study aims to perform a retrospective analysis of the presence of Coronaviruses in tracheal and cloacal swabs of wild and domestic birds from different regions of Brazil, collected between 2004 and 2013; characterize the viruses found, by partial sequencing of the gene of the *RNA-dependent RNA polymerase* (RpRd) in positive samples and accomplish the molecular characterization of found viruses, by partial sequencing of the gene RpRd in positive samples and phylogenetic analysis, in order to correlate the epidemiology of the virus found the bird migration routes and the proximity of urban and poultry regions, verifying the possibility transmission to humans and animals. Thereunto, the samples were subjected to total RNA extraction followed by Reverse Transcription (RT), Polymerase Chain Reaction (PCR) and Nested-PCR reactions with primers that target the RpRd gene and the results were visualized by agarose gel electrophoresis. Positive samples were purified and sequenced. Once Coronaviruses S protein gene are too much variable between different groups, only positive samples for the *Gammacoronavirus* group were also subjected to similar protocols with primers that target two regions of the IBV's S protein gene. Of the amount of 746 samples tested, 25 were positive for Coronavirus in PCR and nested PCR tests with primers for RpRd gene and were sequenced. We have succeeded in sequencing 7 of these samples which 4 were

positive for *Gammacoronavirus* and 3 for *Deltacoronavirus*. In attempt of sequencing the S protein gene, of the 4 *Gammacoronavirus* found, we have succeeded in a chicken sample (*Gallus gallus*) collected in Ilha de Marajó-PA. This sample showed sequence being identified as a strain of IBV, closely related to strains previously detected in Brazil. This work is unprecedented in Brazil, as demonstrates the presence of *Gamma* and *Deltacoronavirus* in birds circulating in different regions of the country, close to urban areas and poultry industries, showing evidence that wild birds may carry these Coronavirus between different migratory sites in Brazil.

Keywords: Coronavirus. Wild birds. Domestic birds. Migratory birds. Molecular biology. Brazil.

1 INTRODUÇÃO

Os Coronavírus (CoVs) são uma grande família de vírus envelopados com RNA de fita simples (ssRNA) e senso positivo, conhecidos desde meados de 1960, capazes de infectar uma grande quantidade de hospedeiros e causar diferentes doenças respiratórias, entéricas, hepáticas e de sistema nervoso. Devido ao seu mecanismo único de replicação, os CoVs têm uma tendência a sofrer recombinações e mutações, o que permite que se adaptem constantemente a novos hospedeiros e nichos ecológicos (WOO et al., 2012).

Até 2003 pouco se sabia a respeito desses vírus e somente 10 CoVs eram conhecidos, foi quando ocorreu a emergência da Síndrome Aguda Respiratória Severa (SARS), que se disseminou rapidamente para mais de doze países na América do Norte, América do Sul, Europa e Ásia, provocando a morte de 800 pessoas até 2004. A emergência dessa nova doença levou à descoberta de diversos novos CoVs (WOO et al., 2010).

A princípio, a divisão dos CoVs foi feita de acordo com suas características genotípicas e sorológicas, a princípio, esses vírus foram divididos em 3 grupos chamados de 1, 2 e 3. De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*, hoje esses grupos foram renomeados para os gêneros *Alphacoronavirus* (grupo 1), *Betacoronavirus* (grupo 2), *Gammacoronavirus* (grupo 3) e *Deltacoronavirus*, recentemente proposto (WOO et al., 2012).

Tendo em vista que as aves são reservatório para a maioria dos vírus emergentes devido ao hábito de andar em bandos e sua habilidade para voar por longas distâncias, as aves possuem potencial para disseminar vírus emergentes entre si, para outros animais e humanos. A diversidade de rotas migratórias e espécies de aves no Brasil pode trazer diversos patógenos ao país, incluindo os CoVs (LI et al., 2004).

O estudo dos CoVs em aves no Brasil é, portanto, de grande importância econômica, pois algumas espécies tais como a causadora da Bronquite Infecciosa, que acomete trato respiratório, gastrointestinal e reprodutor, levando a taxa de mortalidade de 30% (CAVANAGH, 2007) e ainda quedas nas taxas de postura e eclodibilidade dos ovos (FENG et al., 2012), podem acometer criações acarretando grandes perdas, quanto epidemiológica, uma vez que no país há

uma enorme biodiversidade, com um grande número aves domésticas e silvestres, residentes e migratórias provenientes de diversas localidades, o que facilita a dispersão de doenças e o aparecimento de novos vírus. Deve-se considerar também um papel em saúde pública, pois há possibilidade do encontro de CoVs com potencial zoonótico ou ainda que possam contribuir para os estudos da origem desses vírus, tais como dos agentes causadores da SARS e da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS).

2 CONCLUSÃO

Neste trabalho apresentamos um estudo retrospectivo detectando a presença de Coronavírus em aves migratórias e residentes de diferentes regiões do Brasil.

Na caracterização molecular, foram demonstrados Coronavírus do grupo *Gammacoronavírus* em uma galinha (*Gallus gallus*) proveniente da região Norte, um cisne chinês (*Anser cygnoides*) da região Sudeste e duas espécies de maçaricos (*Calidris alba* e *Calidris fuscicollis*) na região Sul enquanto Coronavírus do grupo *Deltacoronavírus* foram encontrados em dois cisnes chineses (*Anser cygnoides*) da região Sudeste e em um vira-pedras (*Rynchops niger*) da região Sul. A detecção de *Deltacoronavírus* circulando em aves é inédita no país. No sequenciamento de regiões de S1 do gene da proteína S do *Gammacoronavírus* na amostra de galinha, foi obtida sequência semelhante a cepas de IBV encontradas no Brasil.

A proximidade entre os vírus encontrados em diferentes regiões do país mostra evidências de que aves silvestres podem carrear estes Coronavírus entre diferentes sítios migratórios no Brasil.

A presença de *Delta* e *Gammacoronavírus* em um grande parque dentro da cidade de São Paulo, na região Sudeste, demonstra a circulação desses vírus em áreas urbanas e a proximidade das granjas avícolas presentes nesta região.

REFERÊNCIAS*

BELOUZARD, S. et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. **Viruses**, v. 4, n. 6, p. 1011–1033, 2012.

BELOUZARD, S.; MADU, I.; WHITTAKER, G. R. Elastase-mediated activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein at discrete sites within the S2 domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 30, p. 22758–22763, 2010.

BERGMANN, C. C.; LANE, T. E.; STOHLMAN, S. A. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. **Nature reviews. Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 121–132, 2006.

BOERE, G.; STROUD, D. The flyway concept: what it is and what it isn't. In: _____ (eds) **Waterbirds around the world. A global overview of the conservation, management and research of the world's waterbird flyways**. Edinburgh: The Stationary Office, 2006. p. 40–47.

CARDOSO, T. C. et al. Genetically diverse coronaviruses in captive bird populations in a Brazilian zoological park. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 2, p. 165–168, 2011.

CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, p. 281–297, 2007.

CHACON, J. L. et al. Epidemiological survey and molecular characterization of avian infectious bronchitis virus in Brazil between 2003 and 2009. **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 40, n. 2, p. 153–162, 2011.

CHAN, J. F. W. et al. Interspecies transmission and emergence of novel viruses: Lessons from bats and birds. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 10, p. 544–555, 2013.

CHEUNG, P. P. et al. Identifying the species-origin of faecal droppings used for avian influenza virus surveillance in wild-birds. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. 1, p. 90–93, 2009.

CHU, D. K. W. et al. Avian Coronavirus in Wild Aquatic Birds. **Journal of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12815–12820, 2011.

DE GROOT, R. J. et al. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV); Announcement of the Coronavirus Study Group. **Journal of virology**, v. 5, n. May, p. 13–15, 2013.

DEVELEY, P. F.; GOERCK, J. M. Áreas Importantes para a Conservação das Aves nas Américas- Brasil. **Important Bird Areas Americas - Priority sites for biodiversity conservation**, p. 15, 2009.

FABIAN, L.; NARANJO, N. Isolamento e propagação de Astrovírus , Adenovírus , Coronavírus , Parvovírus , Rotavírus e Reovírus de aves comerciais com problemas entéricos em ovos embrionados Isolamento e propagação de Astrovírus , Adenovírus , Coronavírus , Parvovírus , Rotavírus e. 2011.

FENG, J. et al. Virulent Avian Infectious Bronchitis Virus, People's Republic of China. v. 18, n. 12, 2012.

GÓES, L. G. B. CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE. 2012.

GOUGH, R. E. et al. Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazona viridigenalis* Cassin). **Avian pathology : journal of the W.V.P.A.**, v. 35, n. 2, p. 122–126, 2006.

GRAHAM, R. L.; BARIC, R. S. Recombination, reservoirs, and the modular spike: mechanisms of coronavirus cross-species transmission. **Journal of virology**, v. 84, n. 7, p. 3134–3146, 2010.

GROSSOEHME, N. E. et al. Coronavirus N Protein N-Terminal Domain (NTD) Specifically Binds the Transcriptional Regulatory Sequence (TRS) and Melts TRS-cTRS RNA Duplexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 394, n. 3, p. 544–557, 2009.

HAGEMEIJER, M. C.; ROTTIER, P. J. M.; DE HAAN, C. A. M. Biogenesis and dynamics of the coronavirus replicative structures. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 3245–3269, 2012.

HURST, K. R. et al. An interaction between the nucleocapsid protein and a component of the replicase-transcriptase complex is crucial for the infectivity of coronavirus genomic RNA. **Journal of virology**, v. 84, n. 19, p. 10276–10288, 2010.

ICMCBIO. **Relatório Anual de Rotas e Áreas de Concentração de aves migratórias no Brasil**. Brasília, DF: CEMAVE/ICMBio, 2014. 87 p.

IGNJATOVIĆ, J.; SAPATS, S. Avian infectious bronchitis virus. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 19, n. 2, p. 493–508, 2000.

KOPECKY-BROMBERG, S. A et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. **Journal of virology**, v. 81, n. 2, p. 548–557, 2007.

LANE, B. et al. The ecology of bird migration patterns. n. Newton 2008, p. 1–3, 2011.

LI, K. S. et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. **Nature**, v. 430, n. 6996, p. 209–213, 2004.

LIAIS, E. et al. Novel Avian Coronavirus and Fulminating Disease in Guinea Fowl, France. **Emerging Infectious Diseases**. v. 20, n. 1, p. 105–108, 2014.

LU, X. et al. SARS-CoV nucleocapsid protein antagonizes IFN- β response by targeting initial step of IFN- β induction pathway, and its C-terminal region is critical for the antagonism. **Virus Genes**, v. 42, n. 1, p. 37–45, 2011.

MAEDA, J. et al. Membrane topology of coronavirus E protein. **Virology**, v. 281, n. 2, p. 163–169, 2001.

MCBRIDE, R.; VAN ZYL, M.; FIELDING, B. The Coronavirus Nucleocapsid Is a Multifunctional Protein. **Viruses**, v. 6, n. 8, p. 2991–3018, 2014.

MCDONALD, S. M.; PATTON, J. T. Viral Genome Replication. **Genome**, p. 201–224, 2009.

MIHINDUKULASURIYA, K. A et al. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray. **Journal of virology**, v. 82, n. 10, p. 5084–5088, 2008.

MILNE-PRICE, S.; MIAZGOWICZ, K. L.; MUNSTER, V. J. The emergence of the Middle East Respiratory Syndrome coronavirus. **Pathogens and Disease**, v. 71, n. 2, p. 121–136, jul. 2014.

MURADRASOLI, S. et al. Prevalence and phylogeny of coronaviruses in wild birds from the bering strait area (Beringia). **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. 1–7, 2010.

NARAYANAN, K. et al. Characterization of the coronavirus M protein and nucleocapsid interaction in infected cells. **Journal of virology**, v. 74, n. 17, p. 8127–8134, 2000.

OSVALDO, W. et al. Evolução da avicultura de corte no Brasil. p. 1666–1684, 2014.

PERLMAN, S.; NETLAND, J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 439–450, 2009.

PINTO, C. D. O. **As grandes migrações continentais**. 2002. 29 f. Monografia (Licenciado em Ciências Biológicas). Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília. 2002.

POON, L. L. M. et al. Identification of a Novel Coronavirus in Bats Identification of a Novel Coronavirus in Bats. **Society**, v. 79, n. 4, p. 2001–2009, 2009.

SATIJA, N.; LAL, S. K. The molecular biology of SARS coronavirus. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1102, p. 26–38, 2007.

SAWICKI, S. G.; SAWICKI, D. L.; SIDDELL, S. G. A contemporary view of coronavirus transcription. **Journal of virology**, v. 81, n. 1, p. 20–29, 2007.

SILVA, M. A. D. P. et al. Oferta de exportação de carne de frango do Brasil, de 1992 a 2007. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n. 1, p. 31–53, 2011.

VALENTE, R. D. M. et al. **Conservação de Aves Migratórias Neárticas no Brasil**. 1ª Ed. Belém: Conservação Internacional – CI-Brasil, 2011. 400 p.

VILLARREAL, L. Y. B. et al. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Brazil from 2007 to 2008 in breeders, broilers, and layers. **Avian diseases**, v. 54, n. 2, p. 894–898, 2010.

VOILÀ, M.; TRICHES, D. A cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2010. **Pesquisas Econômicas e Sociais**, n. 044. 2013.

WERTHEIM, J. O. et al. A case for the ancient origin of coronaviruses. **Journal of virology**, v. 87, n. 12, p. 7039–45, 2013.

WOO, P. C. Y. et al. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. **Viruses**, v. 2, n. 8, p. 1805–1820, 2010.

WOO, P. C. Y. et al. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavi. **Journal of Virology**, v. 86, n. 7, p. 3995–4008, 2012.

World Health Organization (WHO). Alert, verification and public health management of SARS in the post-outbreak period, 2004. Disponível em <http://www.who.int/csr/sars/postoutbreak/en>. Acesso em: 20/05/15

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Summary of Current Situation , Literature Update and Risk Assessment. July, 2015. Disponível em http://www.wpro.who.int/outbreaks_emergencies/wpro_coronavirus/en/. Acesso em: 20/05/15.

WU, K. et al. Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 12, p. 8904–8911, 2012.

ZIEBUHR, J. Molecular biology of severe acute respiratory syndrome coronavirus. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 412–419, 2004.

ZÚÑIGA, S. et al. Coronavirus nucleocapsid protein facilitates template switching and is required for efficient transcription. **Journal of virology**, v. 84, n. 4, p. 2169–2175, 2010.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.