

## Pesquisa de rotavírus em aves silvestres da região amazônica mantidas em cativeiro no estado do Pará, Brasil\*

Monique Araújo Luz<sup>1+</sup>, Delana Andreza Bezerra<sup>2</sup>, René Ribeiro da Silva<sup>3</sup>, Andrey do Nascimento Guerreiro<sup>4</sup>, Larissa dos Santos Seixas<sup>5</sup>, Renata Kelly Gonzaga Bastos<sup>5</sup>, Joana D'Arc Pereira Mascarenhas<sup>6</sup>, Carla Cristina Guimarães de Moraes<sup>7</sup>, Nazaré Fonseca de Souza<sup>8</sup> e Andre Marcelo Conceição Meneses<sup>9</sup>

**ABSTRACT.** Luz M.A., Bezerra D.A., Silva R.R., Guerreiro A.N., Seixas L.S., Bastos R.K.G., Mascarenhas J. D'Arc P., Moraes C.C.G., Souza N.F. & Meneses A.M.C. [Rotavirus research in Amazon wild birds kept in captivity in the state of Pará, Brazil.] Pesquisa de rotavírus em aves silvestres da região amazônica mantidas em cativeiro no estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(2):167-173, 2014. Instituto da Saúde e Produção animal na Amazônia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Avenida Presidente Tancredo Neves, 2501, Montese, Belém, PA 66077-901, Brasil. E-mail: monique.luz@ufra.edu.br

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

---

\* Recebido em 13 de agosto de 2012.

Aceito para publicação em 15 de janeiro de 2014.

<sup>1</sup> Médica-veterinária, MSc., Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Bairro Montese, Belém, PA 66077-550, Brasil. \*Autora para correspondência, E-mail: monique.luz@ufra.edu.br

<sup>2</sup> Farmacêutica, MSc, Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rodovia BR 316-Km 07, S/N, Levilândia, Ananindeua, PA 67030-000, Brasil. E-mail: delana.melo@gmail.com

<sup>3</sup> Médico-veterinário, MSc. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rodovia BR 316-Km 07, S/N, Levilândia, Ananindeua, PA 67030-000. E-mail: renesilva@iec.pa.gov.br

<sup>4</sup> Médico-veterinário, MSc, Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Federal do Pará. Av. dos Universitários s/n, Jaderlandia, Castanhal, PA 68746-360, Brasil. E-mail: andreyguerreiro23@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Médica-veterinária, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Bairro Montese, Belém, PA 66077-550, Brasil. E-mail: lasseixas@hotmail.com, renatabast@gmail.com

<sup>6</sup> Farmacêutica, DSc, Seção de Virologia, Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Rodovia BR 316-Km 07, S/N, Levilândia, Ananindeua, PA 67030-000. E-mail: joanamascarenhas@iec.pa.gov.br

<sup>7</sup> Médica-veterinária, DSc, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará, Av. dos Universitários s/n, Jaderlandia, Castanhal, PA 68746-360. E-mail: cmoraes@ufpa.br

<sup>8</sup> Médica-veterinária, DSc, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Bairro Montese, Belém, PA 66077-550. E-mail: nazavet@bol.com.br

<sup>9</sup> Médico-veterinário, DSc, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Av. Presidente Tancredo Neves, 2501, Bairro Montese, Belém, 66077-550. E-mail: andre.meneses@ufra.edu.br

EGPA and by RT-PCR, requiring, however, further studies aimed in wild birds kept in captivity to determine the role of these species in the rotavirus epidemiology.

**KEY WORDS.** Rotavirus, wild birds, captive, RT-PCR, PAGE.

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

**PALAVRAS-CHAVE.** Rotavírus, aves silvestres, cativeiro, RT-PCR, EGPA.

## INTRODUÇÃO

Os rotavírus (RV) são reconhecidamente os agentes virais mais importantes associados à doença entérica em mamíferos, incluindo o homem, e em diversas espécies aviárias, principalmente as comerciais (Tamehiro et al. 2003, Ursu et al. 2009, Silva et al. 2012). São vírus esféricos da família *Reoviridae*, destituídos de envelope lipoproteico e cujo genoma é constituído por 11 segmentos de RNA de dupla fita (dsRNA), que codificam proteínas estruturais (VP1-VP4, VP5 e VP7) e não estruturais (NSP1-NSP6). Cada segmento codifica uma proteína, com exceção do 11º que codifica duas proteínas não estruturais (NSP5 e NSP6) (Estes & Kapikian 2007).

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

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

## MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa teve autorização do Ministério do Meio Ambiente (MMA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), Sistema de Autorização e Informações em Biodiversidade (Sisbio), sob o número 21364-1 e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (Unesp), campus de Botucatu, protocolo nº 18/2011.

Foram utilizadas 74 amostras fecais de aves da ordem Psittaciformes (família Psittacidae), seis amostras de aves da ordem Falconiformes (família Accipitridae) e três amostras de aves da ordem Ciconiiformes (famílias Ardeidae e Threskiornithidae), totalizando 83 amostras coletadas no período compreendido entre março de 2011 e fevereiro de 2012.

Do total de amostras, 23 eram provenientes do Bioparque Amazônia Crocodilo Safari, 19 do Parque Ecológico Mangal das Garças, 15 do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) e 12 do Jardim Zoobotânico da Amazônia Bosque Rodrigues Alves, localizados na Mesorregião Metropolitana de Belém/Pará, Brasil (latitude 01°27'21" sul e longitude 48°30'16" oeste). As demais amostras (n=14) eram provenientes da Fazenda Paricuiã, no município de Terra Alta, Mesorregião Nordeste Paraense, Brasil (latitude 01°02'28" sul e longitude 47°54'27" oeste).

Não houve coleta de informações acerca da presença ou ausência de sintomatologia clínica condizente com rotavirose nos animais estudados, incluindo diarreia, bem como informações precisas quanto à faixa etária desses animais, no entanto, sabe-se que os mesmos já se encontravam em idade adulta.

As amostras foram coletadas diretamente dos recintos/gaiolas em que as aves eram mantidas, forrando-se temporariamente com papel alumínio os locais abaixo dos poleiros, até a obtenção das fezes. Em caso de inviabilidade dessa técnica, adotou-se o método alternativo, realizando-se a coleta diretamente do solo. Dos recintos/gaiolas que continham apenas um animal, foram coletadas amostras individuais (n= 29) e daqueles em que eram mantidos mais de um animal, foram coletados *pools* de fezes (n=54). Neste último caso, a média era de seis animais presentes, obtendo-se uma amostra representativa dessa população.

As amostras foram depositadas em tubos criogênicos estéreis e mantidas sob-refrigeração até sua chegada ao Laboratório de Rotavírus (Seção de Virologia) do Instituto Evandro Chagas, Ananindeua, PA (latitude 01°21'56" sul e longitude 48°22'20" oeste), onde foram processadas.

Primeiramente foram preparadas suspensões fecais a 10% em tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4), acrescido de clorofórmio, através das quais o dsRNA viral foi extraído seguindo técnica descrita por Boom et al. (1990). Após a extração, essas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (EGPA) para detecção dos grupos de rotavírus presentes e análise dos perfis eletroforéticos, de acordo com Pereira et al. (1983). A partir de então foi realizada a RT-PCR com os *primers* RD6F/ RD6R, específicos para a amplificação do gene VP6 do grupo D de rotavírus, e com os primers Seg 10-c-s/ Seg 10-c-as, específicos para a amplificação do gene NSP4 de rotavírus A de aves (Tabela 1).

Para obtenção do DNA complementar (cDNA), primeiramente 3 µL de cada dsRNA extraído foram adicionados a 1 µL de cada par de iniciadores (20 mM Invitrogen) seguido por desnaturação durante 5 min a 95°C, aos quais foram acrescidos 16,5 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e DNase, 2,5 µL de tampão 10x (Invitrogen), 1 µL de dNTPs (10 mM, Invitrogen), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM, Invitrogen) e 0,25 µL de RT (SuperScript™ II, 20U, Invitrogen) totalizando um volume de 25 µL, numa reação realizada durante 1 hora a 42°C. A PCR foi então

realizada num volume final de 50 µL, acrescentando-se às amostras de cDNA obtidas, 18,5 µL de H<sub>2</sub>O livre de RNase e DNase, 2,5 µL de tampão First-stand 10x (Invitrogen), 3 µL de dNTPs (10 mM, Invitrogen), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> (50mM, Invitrogen) e 0,25 µL de Taq DNA polymerase (2,5 U/µL, Invitrogen).

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

Cada reação foi analisada por eletroforese horizontal em gel de agarose com visualização em transiluminador com emissão de raios ultravioleta (UV) (GEL DOC 1000).

## RESULTADOS

Todas as amostras testadas pela técnica de EGPA apresentaram resultados negativos, não sendo observado nenhum perfil eletroforético condizente com algum grupo de rotavírus, exceto na amostra sabidamente positiva, utilizada como controle positivo para o teste. Da mesma forma, em todas as amostras testadas por RT-PCR, com exceção das amostras utilizadas como controle positivo para as reações, não foi observada nenhuma amplificação dos genes estudados, demonstrando resultado negativo em todas as amostras teste.

## DISCUSSÃO

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

Assim como em mamíferos, a maioria dos estir-

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

Primers	Sequência 5'-3'	Gene/ Grupo	Fragmento amplificado (pb)
RD6F (+) <sup>a</sup>	GAGGCGCTGTCTCAATTGCG	VP6/D	742
RD6R (-)	TGGCCAATAGTGTGTGGCAGCT		
Seg 10-c-s (+) <sup>b</sup>	GGAAAGATGGAGAACGYACCA	NSP4/A	645
Seg 10-c-as (-)	GTGGGGTACCAGGGATTAAG		

<sup>a</sup>- RD6F(+): RV-D segmento 6 Forward (direto); RD6R(-): RVs-D segmento 6 Reverse (reverso) (Bezerra et al., 2012)

<sup>b</sup>- Seg 10-c-s(+): Segmento 10-chicken-sense (senso); Seg 10-c-as (-): Segmento 10-chicken-antisense (antiseno) (Trojnar et al., 2009).

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

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

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

Inicialmente buscou-se a detecção de rotavírus nos espécimes fecais das aves pela técnica de EGPA, por ser um dos métodos mais empregados, tanto em animais como em humanos, e que permite a visualização do perfil eletroforético de qualquer grupo de rotavírus (Gouvea et al. 1990, Estes & Kapikian 2007), no entanto, todas as amostras testadas no presente estudo apresentaram resultados negativos, o que pode estar relacionado com a baixa sensibilidade apresentada pela técnica (Otto et al. 2011). No estudo conduzido por Otto et al. (2011), em frangos de corte e perus provenientes de cinco países europeus e de Bangladesh, foram encontrados 42,70% de positividade para rotavírus através da técnica de EGPA, com amostras positivas para um dos grupos, A e D, e para ambos os grupos.

No Brasil, uma alta taxa de infecção em frangos de corte foi detectada por Villarreal et al. (2006), onde 45,3% dos frangos demonstraram eletrotipos condizentes com rotavírus A na EGPA, no entanto, baixas taxas de infecção, com o uso dessa mesma técnica, também já foram detectadas no Brasil, por Tamehiro et al. (2003), encontrando apenas 8,5% de positividade para rotavírus, os quais não foram classificados em grupos.

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

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

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

completo de uma amostra de frango, demonstrou haver estreita relação entre as sequências nucleotídicas desse gene disponíveis para amostras aviárias, levando a acreditar que não há grandes divergências nessas sequências entre diferentes ordens e espécies de aves.

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

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

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

Outro fator que pode ter contribuído para a

obtenção de resultados negativos na presente pesquisa foi a baixa densidade populacional de aves por recinto/gaiolas nos cativeiros. De acordo com Alfieri et al. (1999), a alta densidade populacional contribui para o aumento da frequência de diagnósticos de rotavírus, e no caso do presente estudo, os cativeiros abrigavam em média apenas seis aves por recinto/gaiola.

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

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

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

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

dos de ocorrência e manifestação desses patógenos em diferentes indivíduos silvestres (Villani 2007).

Já foi levantada a hipótese de que os animais que têm contacto estreito com o homem, podem, eventualmente, ter um papel importante em infecções por rotavírus em seres humanos (Minamoto et al., 1988). No entanto, esse papel das aves silvestres é desconhecido pela falta de dados das sequências nucleotídicas de rotavírus aviários que permitam a identificação destes vírus e detecção de fragmentos de seus genomas nas amostras humanas (Shumann et al. 2009).

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

## CONCLUSÃO

As aves silvestres do presente estudo não foram positivas para rotavírus, não sendo detectado nenhum grupo desse vírus nas amostras fecais das mesmas, mesmo quando investigado especificamente a presença dos grupos A e D nessas espécies. Os resultados negativos apresentados aqui são de suma importância para a conservação dessas espécies, no entanto, é necessária a realização de mais estudos que visem a detecção de rotavírus em aves silvestres, afim de que se esclareça o papel dessas aves na epidemiologia da doença.

**Agradecimentos.** A Stefânia Miranda, Aline Imbeloni, Antonio Messias Costa, Jorge Aarão; Amanda Paula Danin, Nivia Magalhães Freitas, Dinaíara Frago e Dennis Lima pelo apoio nas coletas das amostras, e aos integrantes do Laboratório de Rotavírus da Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas, PA, pelo apoio no processamento das amostras.

## REFERÊNCIAS

- Andriolo A. Desafios para a conservação da fauna, p. 252-287. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), *Tratado de animais selvagens medicina veterinária*. Roca, São Paulo, 2007.
- Ahmed M.S. & Ahmed M.U. Detection of avian rotavirus-like virus in broiler chickens in Bangladesh. *Bangl. J. Vet. Med.*, 4:73-77, 2006.
- Alfieri A.A., Alfieri A.F., Beuttemüller E.A., Brito B.G. & Médici K.C. Aspectos epidemiológicos da rotavírose suína na região sudoeste do Estado do Paraná, Brasil. *Semina: Cienc. Agr.*, 20:5-11, 1999.
- Benskin C.M., Wilson K., Jones K. & Hartley I.R. Bacterial pathogens in wild birds: a review of the frequency and effects of infection. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 84:349-73, 2009.
- Bezerra D.A., Silva R.R., Kaiano J.H.L., Silvestre R.V.D., Oliveira D.S., Linhares A.C., Gabbay Y.B. & Mascarenhas J.D.P. Detection of avian group D rotavirus using the polymerase chain reaction for the VP6 gene. *J. Virol. Meth.*, 2012. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.017]
- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-Van Dillen P.M.E. & Van Der Noordaa J. Rapid and simple method for purifications of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 28:495-503, 1990.
- Cook S.M., Glass R.I., LeBaron C.W. & Mei-Shang H. Global seasonality of rotavirus infections. *Bull. World Health Org.*, 66:171-177, 1990.
- Estes M.K. & Kapikian A.Z. Rotaviruses, p.1917-1957. In: Knipe D.M., Howley P.M. & Griffin D.E. (Eds), *Virology*. 5<sup>th</sup> ed. Williams and Wilkins, Lippincott, 2007.
- Gough R.E., Alexander D.J., Collins M.S., Lister S.A. & Cox W.J. Routine virus isolation or detection in the diagnosis of diseases in birds. *Avian Pathol.*, 17:893-907, 1988.
- Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B. & Fang Z.Y. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 28:276-282, 1990.
- Guy J.S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. *Poultry Sci.*, 77:1166-1175, 1998.
- Islam M.S., Alam M.M., Rahman M.M. & Ahmed M.U. Rotavirus infection in human and birds. *Bangl. J. Vet. Med.*, 7:314-319, 2009.
- Ito H., Sugiyama M., Masubuchi K., Mori Y. & Minamoto N. Complete nucleotide sequence of a group A avian rotavirus genome and a comparison with its counterparts of mammalian rotaviruses. *Virus Res.*, 75:123-138, 2001.
- Karim M.R., Rume F.I., Alam M.M. & Ahmed M.U. Molecular epidemiologic study on avian rotavirus prevailing in Bangladesh. *Bangl. J. Vet. Med.*, 5:43-48, 2007.
- Levy K., Hubbard A.E. & Eisenberg J.N.S. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.*, 38:1487-1496, 2009.
- Minamoto N., Oki K., Tomita M., Kinjo T. & Suzuki Y. Isolation and characterization of rotavirus from feral pigeon in mammalian cell cultures. *Epidemiol. Inf.*, 100:481-492, 1988.
- Niture G.S., Karpe A.G., Prasad M., Bhonsle A.V. & Patil S.V. Detection of Group D avian rotaviruses among layer poultry from western India. *Int. J. Poul. Sci.*, 9:72-76, 2010.
- Otto P., Liebler-Tenorio E.M., Elschner M., Reetz J., Lohren U. & Dille R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (rss). *Avian. Dis.*, 50:411-418, 2006.
- Otto P.H., Ahmed M.U., Hotzel H., Machnowska P., Reetz J., Roth B., Trojnar E. & Johne R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet. Microbiol.*, 156:8-15, 2011.
- Pereira H.G., Azeredo R.S., Leite J.P., Barth O.M., Suttmoller F., De Farias V. & Vidal M.N. Comparison of polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE), Immuno-electron microscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. *Mem. Int. Osw. Cruz.*, 78:483-490, 1983.
- Rohwedder A., Hotop H. & Brüssow H. Chicken rotavirus Ch-1 shows a second type of avian VP6 gene. *Virus Genes*, 15:65-71, 1997.
- Savita K.A.L., Malik Y.P.S. & Minakshi P.G. Detection and characterization of group A and D avian rotaviruses in India. *Indian J. Biotech.*, 7:554-556, 2008.
- Silva L.C., Sanches A.A., Gregori F., 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*). *Res. Vet. Sci.*, 93:1066-1069, 2012.
- Schumann T., Hotzel H., Otto P. & Johne R. Evidence of interspecies transmission and reassortment among avian group A rotaviruses. *Virology*, 386:334-343, 2009.
- Takehara K., Kiuchi H., Kuwahara M., Yanagisawa F., Mizukami M., Matsuda H. & Yoshimura M. Identification and characterization of a plaque forming avian rotavirus isolated from a wild bird in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 53:479-86, 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. *Braz. J. Microbiol.*, 34:344-348, 2003.
- Trojnar E., Otto P. & Johne E. The first complete genome sequence of a

- chicken group A rotavirus indicates independent evolution of mammalian and avian strains. *Virology*, 386:325-333, 2009.
- Trojanar E., Otto P., Roth B., Reetz J. & John E. The genome segments of a group D rotavirus possess group a-like conserved termini but encode group-specific proteins. *J. Virol.*, 84:10254-10265, 2010.
- Ursu K., Kisfali P., Rigó D., Ivanics E., Erdelyi K., Adam D., Melegh B., Martella V. & Bányai K. Molecular analysis of the VP7 gene of pheasant rotaviruses identifies a new genotype, designated G23. *Arch. Virol.*, 154:1365-1369, 2009.
- Ursu K., Papp H., Kisfali P., Rigó D., Melegh B., Martella V. & Bányai K. Monitoring of Group A Rotaviruses in Wild-Living Birds in Hungary. *Avian Dis.*, 5:123-127, 2011.
- Villarreal L.Y.B., Uliana G., Valenzuela C., Chacón J.L.V., Saldenberg 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. *Braz. J. Poul. Sci.*, 8:187-191, 2006.
- Villani R.G.D.C. Estrutura hospitalar, quarentenário e centros de triagem, p. 252-287. In: Cubas Z.S., Silva J.C.R. & Catão-Dias J.L. (Eds), *Tratado de animais selvagens medicina veterinária*. Roca, São Paulo, 2007.