

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DO *MAMASTROVIRUS 5* EM CÃES NO
BRASIL

CHRISTIAN DINIZ BEDUSCHI TRAVASSOS ALVES

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETECÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DO *MAMASTROVIRUS* 5 EM CÃES NO
BRASIL

Autor: Christian Diniz Beduschi
Travassos Alves
Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre
em Ciências Veterinárias na área de
Virologia
Orientador: Cláudio Wageck Canal
Co-orientador: André Felipe Streck

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Diniz Beduschi Travassos Alves, Christian
DETECÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DO MAMASTROVIRUS 5 EM
CÃES NO BRASIL / Christian Diniz Beduschi Travassos
Alves. -- 2015.
69 f.

Orientador: Cláudio Wageck Canal.
Coorientador: André Felipe Streck.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Virologia Veterinária. 2. Análise
Filogenética. 3. Biologia Molecular. 4.
Gastroenterite Viral Canina. 5. Astrovírus. I. Wageck
Canal, Cláudio , orient. II. Felipe Streck, André,
coorient. III. Título.

Christian Diniz Beduschi Travassos Alves

DETECÇÃO E ANÁLISE GENÔMICA DO *MAMASTROVIRUS* 5 EM CÃES NO
BRASIL

Aprovada em 27 Fevereiro 2015.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Dr. André Felipe Streck
Co-Orientador

Prof. Dr. Ana Paula Ravazzolo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Paulo Michel Roehe
Membro da Comissão

Prof. Dr. Vagner Ricardo Lunge
Membro da Comissão

Ao Professor e bisavô Pery Pinto Diniz da Silva, com quem partilhei na minha infância o que seria o cerne daquilo que veio a se concretizar. Seu exemplo durante e para além da vida foram fundamentais. Desejei a sua orientação em todas as minhas escolhas, desde o princípio.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e seu corpo docente que oportunizaram ambiente e conhecimento para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Cláudio Wageck Canal pela orientação, apoio e confiança.

Meus agradecimentos aos amigos e companheiros de trabalhos que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

A minha mãe Silvana Diniz Beduschi, mulher batalhadora, exemplo de vida em todas as situações em que me deparei nessa minha caminhada até aqui.

Obrigado Marylena Diniz por ser mãe, madrinha e avó completando ausências com seu amor incondicional à sua família.

Agradeço a minha irmã querida, “desenhos que a vida vai fazendo; desbotam alguns, uns ficam iguais; entre corações que tenho tatuados; de você me lembro mais; de você, não esqueço jamais...”(John Lennon).

À minha companhia Bianka Grillo por estar em todas as horas me ajudando a olhar para frente e seguir lutando, buscando sempre o melhor.

Obrigado a minha grande família que sempre me apoiou, por isso hoje quero agradecer por tudo que já fizeram e dizer o quanto são especiais para mim.

Epígrafe

"É claro que somos apenas primatas evoluídos, vivendo em um planeta pequeno que orbita uma estrela comum, localizada no subúrbio de uma de bilhões de galáxias, mas desde o começo da civilização as pessoas tentam entender a ordem fundamental do mundo.

Deve haver algo muito especial sobre os limites do universo, e o que pode ser mais especial do que não haver limites?

Não deve haver limites para o esforço humano.

Somos todos diferentes.

Por pior que a vida possa parecer, sempre há algo que podemos fazer em que podemos obter sucesso.

Enquanto houver vida, haverá esperança." (Stephen Hawking).

RESUMO

O *mamastrovirus* 5 (MAstV5) é classificado no gênero *Mamastrovirus* da família *Astroviridae*, sendo associado com surtos agudos de gastroenterite transitória em filhotes de cães ao redor do mundo. O objetivo desta dissertação foi detectar e analisar a variabilidade genética dos MAstV5 circulantes em cães no Brasil. Para isto, amostras de suabe retal foram coletadas de 269 cães de diferentes regiões do Brasil no período de 2008-2014, dos quais 26,39% foram positivos para MAstV5 através de RT-PCR convencional e de RT-Hemi-nested PCR, amplificando porção conservada do gene do capsídeo e do gene da polimerase, respectivamente. Quatro destas cepas tiveram seu genoma parcialmente sequenciado, caracterizado e analisado filogeneticamente. A caracterização dessas amostras revelou uma notável heterogeneidade genética entre as cepas de MAstV5. A baixa identidade entre as sequências do gene do capsídeo (<85%) indicaria uma possível nova classificação entre a espécie MAstV5 em dois genótipos. Conclui-se que o MAstV5 ocorre em cães no Brasil e as cepas circulantes possuem uma grande diversidade genética.

Palavras-chave: virologia veterinária; análise filogenética; biologia molecular; gastroenterite viral canina; *astrovirus*.

ABSTRACT

The Mamastrovirus 5 (MAstV5) is classified in the genus Mamastrovirus of the Astroviridae family, being associated with acute episodes of transient gastroenteritis in puppies around the world. The aim of this work was to detect and analyze the genetic variability of circulating MAstV5 in dogs in Brazil. For this, rectal swab samples were collected from 269 dogs from different regions of Brazil in the 2008-2014 period, of which 26.39% were positive for MAstV5 by conventional RT-PCR and RT-Hemi-nested PCR, amplifying conserved portion of the capsid gene and polymerase gene, respectively. Four of these strains had its genome sequenced partially characterized and analyzed phylogenetically. The characterization of these samples revealed a remarkable genetic heterogeneity among strains of MAstV5. The low identity between the sequences of capsid gene (<85%) indicate a possible new classification between the two genotypes MAstV5 species. We conclude that the MAstV5 occurs in dogs in Brazil and circulating strains have a high genetic diversity.

Key-words: veterinary virology; phylogenetic analysis; molecular biology; canine viral gastroenteritis; astrovirus.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Microscopia eletrônica de partículas AstV típicas oriundas de fezes humanas. Barra= 100 nm.	16
Figura 2. Árvore filogenética baseada no sequenciamento completo de aminoácidos da ORF2 de cepas de referência de astrovirus presentes no GenBank infectando mamíferos.	19
Figura 3. Reconstrução em terceira dimensão de víriões MAstV1. (a) Sem tratamento de tripsina. (b) Com tratamento de tripsina. VP 34 constitui o cerne do capsídeo e VP 27 e VP 25 constituem as projeções estelares do capsídeo.....	21
Figura 4. Representação esquemática da organização genômica do astrovirus. Os astrovirus são vírus RNA fita simples de polaridade positiva. Apesar da variabilidade genética entre a família, a estrutura genômica é similar entre seus representantes. Para o MAstV-1, o tamanho do genoma é de 6,8 kilobases (kb). Contendo uma região 5' não traduzível (UTR) de 85 nucleotídeos (nt), uma 3' UTR de 83 nt seguida de uma cauda poli-adenilada (An). Após a entrada do vírus na célula hospedeira a ORF1a é imediatamente traduzida para produzir proteínas não estruturais. A combinação de uma sequência AAAAAAC e uma estrutura secundária sinalizadora contribuem para o mecanismo de frameshift, resultando na tradução da ORF1ab e expressão do gene da proteína não estrutural RNA polimerase dependente de RNA. O RNA subgenômico tem 2,4 kb de comprimento e contém uma 5'UTR, 3'UTR seguida de uma cauda poli-adenilada (An) e é transcrito através de um promotor interno contido em sua fita de RNA. A ORF2 é traduzida através deste RNA subgenômico, produzindo a proteína estrutural do capsídeo viral.	22
Figura 5. Representação esquemática das prováveis proteínas estruturais sintetizadas pela ORF1a e ORF1ab. Contendo dois domínios <i>Coiled-Coil</i> (CC), até seis hélices transmembranares, uma serino protease viral (V-Pro), uma provável proteína viral genômica (VPg?) e a RNA polimerase RNA dependente (RdRp).	23
Figura 6. Característica da proteína estrutural VP90 do capsídeo viral. O produto primária da ORF2, denominado VP90, contém dois domínios que podem ser distinguidos através de seu grau de conservação: o domínio hipervariável forma as projeções forma o cerne do capsídeo, enquanto o domínio hipervariável compoem as projeções do capsídeo da partícula viral.	24
Figura 7. (a) Fotografia do efeito citopático induzido pela replicação do MAstV5 em células MDCK. (b) Controle negativo. Microscopia ótica em aumento de 10x.	26
Figura 8. Processamento das proteínas não estruturais. As proteínas não estruturais (nspl a e nsplab) são clivadas por proteases virais e celulares em pelo menos cinco peptídeos.	28
Figura 9. Representação esquemática da replicação do AstV.....	29

Lista de Tabelas

Tabela 1. Percentagem de identidade de aminoácidos na proteína do capsídeo entre as cepas Italy/05 e Bari/08/ITA e demais espécies de <i>astrovirus</i>	25
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

%	porcentagem
A ₆ C	heptâmero
aa	aminoácido
AstV	<i>astrovirus</i>
C1q	proteína C1
CC	<i>coiled-coil</i>
CCoV	coronavírus canino
CDV	vírus da cinomose canina
CPV-2	protoparvovírus canino tipo 2
cDNA	ácido desoxiribonucleico complementar
DNA	ácido desoxiribonucleico
ELISA	imuno-adsorção ligada à enzima
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1 and 2</i>
gRNA	ácido ribonucleico genômico viral
HEK	linhagem celular epitelial renal humana
IgG	imunoglobulina G
Kb	quilobase
kDa	quilodalton
MAstV	<i>Mamastrovirus</i>
MDCK	linhagem celular epitelial renal canina
ME	microscopia eletrônica
MLB	lectina ligadora de manose
nsp	proteína não estrutural
nt	nucleotide
ORF	<i>open reading frame</i>
<i>p-dist</i>	distância genética
RdRp	RNA polimerase dependente de RNA
RNA	ácido ribonucleico
RNAsg	ácido ribonucleico subgenômico viral
S2m	<i>stem-loop II-like motif</i>
SRVs	<i>small round viruses</i>
UTR	região não traduzível

VP proteína viral

VPg proteína viral genômica

V-Pro serino-protease viral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Histórico	16
2.2	Classificação do Gênero <i>Mamastrovirus</i>	17
2.3	Estrutura e Composição do Vírião	20
2.4	Organização Genômica e Biologia dos Astrovírus	21
2.5	Replicação Viral	25
2.6	Epidemiologia e Patogenia da Infecção	29
2.7	Diagnóstico	30
2.8	Controle	32
3	ARTIGO CIENTÍFICO	33
4	DISCUSSÃO	60
5	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Os astrovírus são vírus pequenos, icosaédricos e não envelopados pertencentes a família *Astroviridae*. Seu genoma é composto por RNA fita simples de polaridade positiva, contendo duas regiões não traduzidas em suas extremidades e três fases abertas de leitura (ORF) que codificam tanto proteínas não estruturais, quanto proteínas estruturais. Taxonomicamente, a família é dividida em dois gêneros, denominados *Avastrovirus* e *Mamastrovirus*. Os *Avastrovirus* incluem viroses que causam infecção em diferentes espécies de aves, enquanto os *Mamastrovirus* infectam uma ampla gama de hospedeiros mamíferos, entre eles a espécie canina.

Em mamíferos, a manifestação mais comum da doença está no estabelecimento de um quadro de gastroenterite aguda variando de branda a severa, decorrente de sinais como diarreia, dor abdominal, desidratação e vômito. Em cães, partículas virais com forma típica de *astrovirus* foram primeiramente identificadas no início dos anos 80 por microscopia eletrônica. Recentemente, AstVs têm sido identificados, através da detecção e caracterização molecular, em amostras fecais de cães com sintomas de distúrbios entéricos; por conseguinte, sendo reclassificados em uma espécie distinta de *astrovirus*, o *mamastrovirus 5*, o qual infecta caninos.

Atualmente, métodos de detecção de ácidos nucleicos, como a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, denominadas *reverse transcriptase* PCR (RT-PCR) e *real time* RT-PCR (qRT-PCR), permitem a detecção de fragmentos do RNA genoma viral com alta sensibilidade e especificidade, tornando-se rotineiros nos laboratórios de virologia. Outrossim, a comparação das sequências completas de aminoácidos do capsídeo viral possibilita a classificação das cepas em espécies. Considerando-se o *mamastrovirus 5*, cujo o isolamento viral em cultivo celular é considerado extremamente difícil, as ferramentas de biologia molecular tornam-se essenciais no prosseguimento do estudo para a sua associação com a doença, distribuição geográfica das amostras e determinação dos hospedeiros susceptíveis à infecção.

O presente trabalho teve como principal objetivo realizar a detecção e análise filogenética das amostras de campo de *mamastrovirus 5* circulantes no Brasil, coletadas de fezes de cães de diversos estados brasileiros, apresentando ou não sinais de gastroenterite viral, para comparação entre cepas de referência de outros países, tanto pertencentes à espécie *mamastrovirus 5*, quanto a pertencentes ao gênero *Mamastrovirus*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A denominação *astrovirus* (AstV) foi primeiramente proposta por Madeley e Cosgrove (1975), quando da descrição de partículas virais pequenas (28 a 30 nm) e arredondadas, do termo inglês *small round viruses* (SRVs), com cinco ou seis distintas projeções no seu capsídeo viral, lembrando a aparência de uma estrela (*astron*= estrela em grego). Essas partículas virais foram observadas em fezes de crianças hospitalizadas com sinal clínico de diarreia, através da técnica de microscopia eletrônica (ME) (Figura 1). Subsequentemente, partículas virais de morfologia e tamanho similares foram identificadas pela mesma técnica em diversas espécies de mamíferos e de aves (DE BENEDICTIS et al., 2011). A infecção por AstV está associada a gastroenterite na maioria das espécies animais e, em humanos, a astrovirose é considerada como a segunda causa mais frequente de diarreia viral entre as crianças (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

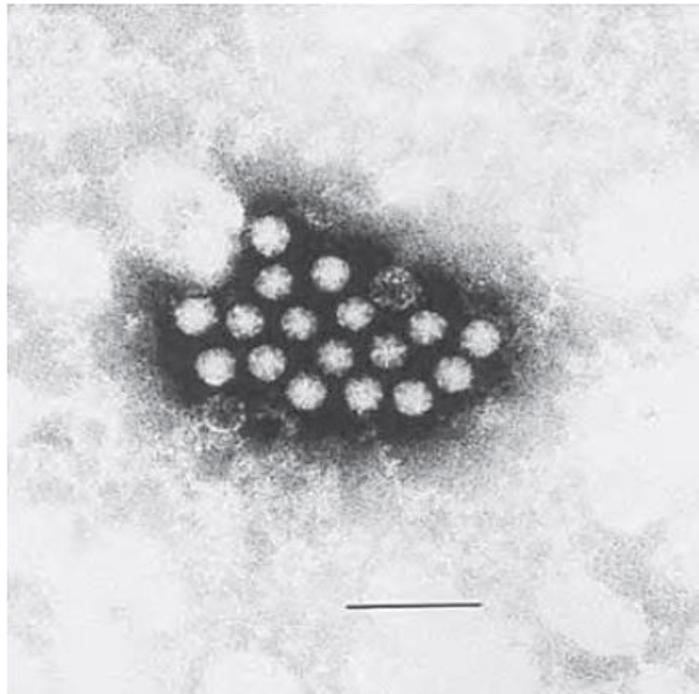


Figura 1. Microscopia eletrônica de partículas AstV típicas oriundas de fezes humanas. Barra= 100 nm.

Fonte: (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

No entanto, partículas SRVs vinham sendo detectadas apenas ocasionalmente em cães através da técnica de ME. Em alguns casos, devido às similaridades morfológicas (tamanho, corpo arredondado e ausência de envelope), essa definição também englobava os vírus da família *Caliciviridae* e *Picornaviridae*, impossibilitando a sua distinção, em casos onde a forma estelar não está evidente (MARTELLA et al., 2011).

Partículas típicas de AstV foram detectadas em filhotes da raça Beagle em 1980, nos EUA. Os filhotes exibiam sinal de diarreia em um quadro de co-infecção com outros patógenos virais conhecidos como: parvovírus canino (CPV-2) e coronavírus canino (CCoVs) (WILLIAMS, 1980). Estudo realizado em 1984 na Austrália detectou partículas AstV típicas em 3/157 amostras fecais normais, porém, em nenhuma e 29 amostras de animais diarreicos (MARSHALL et al., 1984). Posteriormente, em uma ampla amostragem realizada na Alemanha, partículas virais SRVs foram detectadas em 41 de 4044 (1,02%) amostras fecais de cães apresentando diarreia (VIELER; HERBST, 1995). No entanto, a infecção em cães somente foi confirmada através da caracterização genética e do isolamento em cultivo celular, recentemente realizados por meio de coleta de amostras de filhotes com sinais entéricos condizentes com a infecção por *astrovirus*. Assim, foi sugerido que o vírus detectado poderia representar uma espécie viral distinta do AstV infectando caninos, atualmente denominado *mamastrovirus 5* (MAstV5) (TOFFAN et al., 2009; MARTELLA et al., 2011). Dessa maneira, até o momento, MAstV5 ou partículas AstV típicas presentes em amostras de fezes de cães foram descritas na Alemanha, Austrália, Brasil, China, Estados Unidos, França e Itália (CASTRO et al., 2013; GRELLET et al., 2012; MARSHALL et al., 1984; TOFFAN et al., 2009; VIELER; HERBST, 1995; WILLIAMS, 1980; ZHU et al., 2011).

As ferramentas moleculares de caracterização genética dos isolados membros da família *Astroviridae*, subsequentemente, permitiram o reconhecimento de dezenove espécies do gênero *Mamastrovirus* e três espécies do gênero *Avastrovirus*. Além disso, abordagens metagenômicas têm permitido à identificação de novos AstVs, infectando humanos e espécies animais nos últimos anos. Em algumas espécies desses vírus, a eficiente propagação em linhagens celulares e o isolamento em modelos animais têm auxiliado no avanço do entendimento molecular e estrutural, como também na sua patogenia (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

2.2 Classificação do Gênero *Mamastrovirus*

Os *astrovirus* originalmente eram classificados exclusivamente a partir do hospedeiro de origem, porém alguns novos achados denotaram que esse critério deveria ser redefinido e atualizado. Todavia, recentes caracterizações de novos AstVs mostraram que cepas que infectam diferentes espécies de hospedeiros podem ser geneticamente similares, enquanto cepas geneticamente divergentes podem ser encontrados na mesma espécie de hospedeiro. Alguns exemplos incluem recente identificação de *astrovirus*

infectando a espécie humana muito semelhante geneticamente à isolados de hospedeiros animais, como a marta e a ovelha (KAPOOR et al., 2009), além disso a diversidade genética encontrada em amostras infectando suínos (LUO et al., 2011), morcegos (ZHU et al., 2009) e humanos (KAPOOR et al., 2009) coloca-os em um grupo de alta divergência genotípica, pois indica ancestrais diferentes que surgiram provavelmente durante a transmissão interespecie (LUO et al., 2011).

Baseado nesses novos dados, uma classificação fundamentada em critérios genéticos foi elaborada. A análise filogenética dos *mamastrovirus* baseada no sequenciamento de aminoácidos de toda a extensão da *open reading frame 2* (ORF2), região que codifica a poliproteína estrutural do capsídeo, resultou em dois genogrupos (GI e GII) com sete espécies virais, respectivamente. Portanto, as amostras com distância genética (*p-dist*), variando entre 0,378-0,750, e 0,006-0,312, são agrupadas inter- e intra-espécies, respectivamente (BOSCH et al., 2011).

Isto posto, o gênero *Mamastrovirus* (MAstV) abrange cepas originárias de inúmeros mamíferos, incluindo espécies que infectam humanos (*mamastrovirus* 1, 6, 8 e 9), felinos (*mamastrovirus* 2), suínos (*mamastrovirus* 3), leões marinhos californianos (*mamastrovirus* 4 e 11), caninos (*mamastrovirus* 5), golfinhos nariz de garrafa (*mamastrovirus* 7), martas (*mamastrovirus* 10), morcegos (*mamastrovirus* 12, 14, 15, 16, 17, 18 e 19) e ovinos (*mamastrovirus* 13) (BOSCH et al., 2011). A relação filogenética entre membros da família *Astroviridae* pode ser observada na Figura 2.

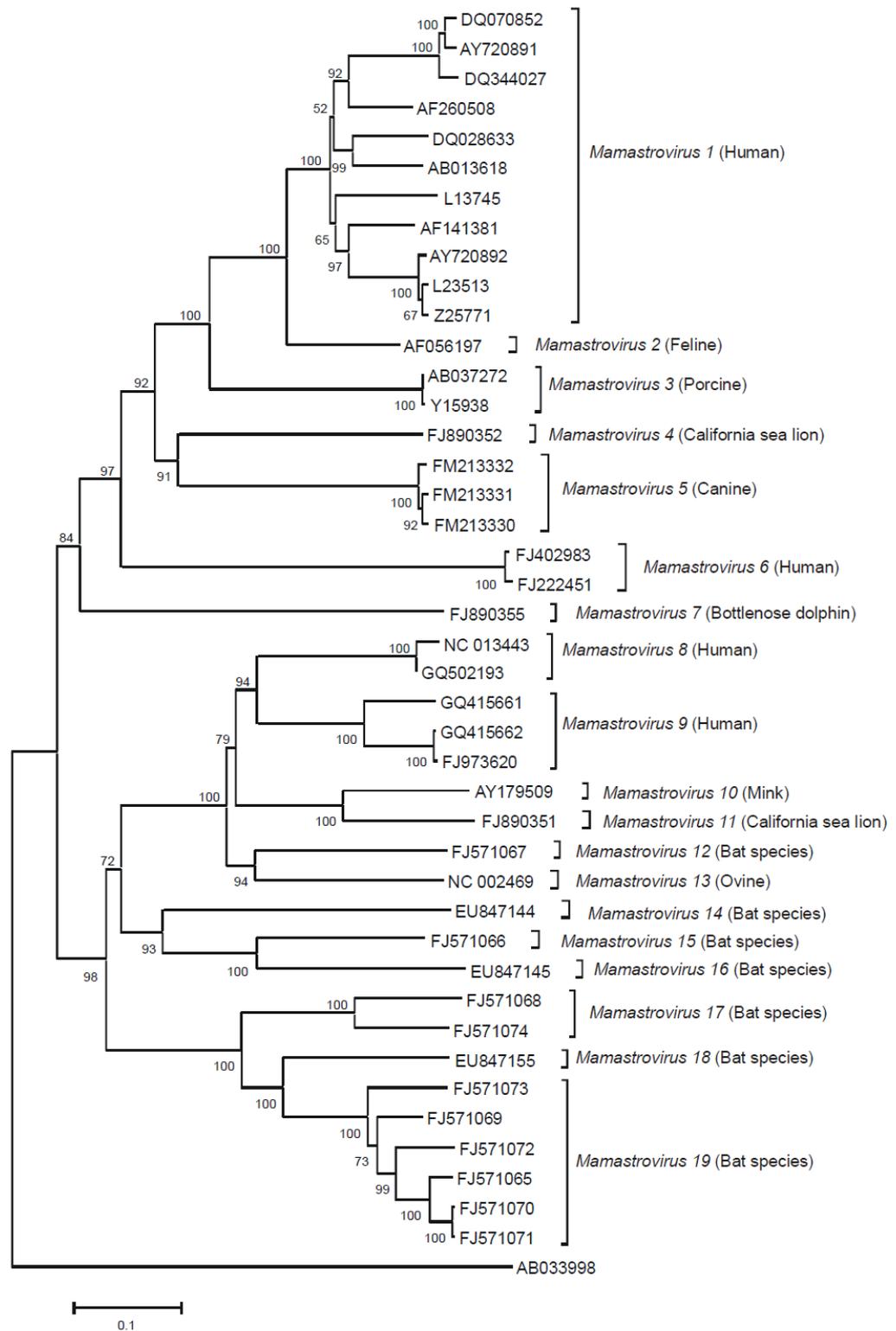


Figura 2. Árvore filogenética baseada no sequenciamento completo de aminoácidos da ORF2 de cepas de referência de *astrovirus* presentes no GenBank infectando mamíferos.

Fonte: (BOSCH et al., 2011).

2.3 Estrutura e Composição do Vírião

Partículas de *astrovirus* são formadas por um genoma viral de RNA circundado por um capsídeo icosaédrico constituído por um única proteína que varia em torno de 70 a 90 *kilodaltons* (kDa) ou por pelo menos três proteínas que variam entre 25 a 34 kDa, dependendo da extensão da clivagem proteolítica do vírião (BELLIOT; LAVERAN; MONROE, 1997; MÉNDEZ et al., 2002; SANCHEZ-FAUQUIER et al., 1994). Essas massas proteicas díspares provavelmente representem produtos de clivagem finais ou intermediários, sendo diferentes em cada espécie de *astrovirus* (BELLIOT; LAVERAN; MONROE, 1997; HERRING; GRAY; SNODGRASS, 1981; SHIMIZU et al., 1990). Até o presente momento, estudos sobre o MAstV5 são deficientes em caracterizar sua estrutura e composição, como também quais massas moleculares teriam seus produtos proteicos finais e intermediários. Ao utilizar, como modelo de comparação, espécies já bem documentadas de *astrovirus* como o MAstV1, que infecta humanos, estipula-se que a proteína do capsídeo tenha uma massa aproximadamente de 84,7 kDa (MARTELLA et al., 2011).

Análises estruturais do MAstV1 propagado em cultivo celular com a presença de tripsina revelou partículas icosaédricas com projeções oriundas do capsídeo viral (RISCO et al., 1995). No entanto as características estruturas tipo "estrela", que deram origem ao nome da família, somente foram reveladas após esse tratamento proteolítico através da tripsina, simulando o que ocorre no intestino hospedeiro. Portanto, singulares diferenças são observadas nas duas partículas, com ou sem tratamento de tripsina (Figura 3). O vírião não tratado contém 180 cópias de uma simples proteína de 70 kDa, arranjada em uma simetria icosaédrica. Duas camadas de proteínas podem ser observadas, sendo que a camada interna forma o cerne do capsídeo viral e é quase idêntico ao vírião tratado com tripsina. Todavia, a camada mais externa que forma a típica estrutura estelar, demonstra dramática alteração após o tratamento com tripsina. Esse tratamento resulta na clivagem da proteína 70 kDa em três polipeptídeos necessários para a infectividade viral. Portanto, a principal diferença entre as estruturas é o número de projeções da proteína de 70 kDa observadas (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

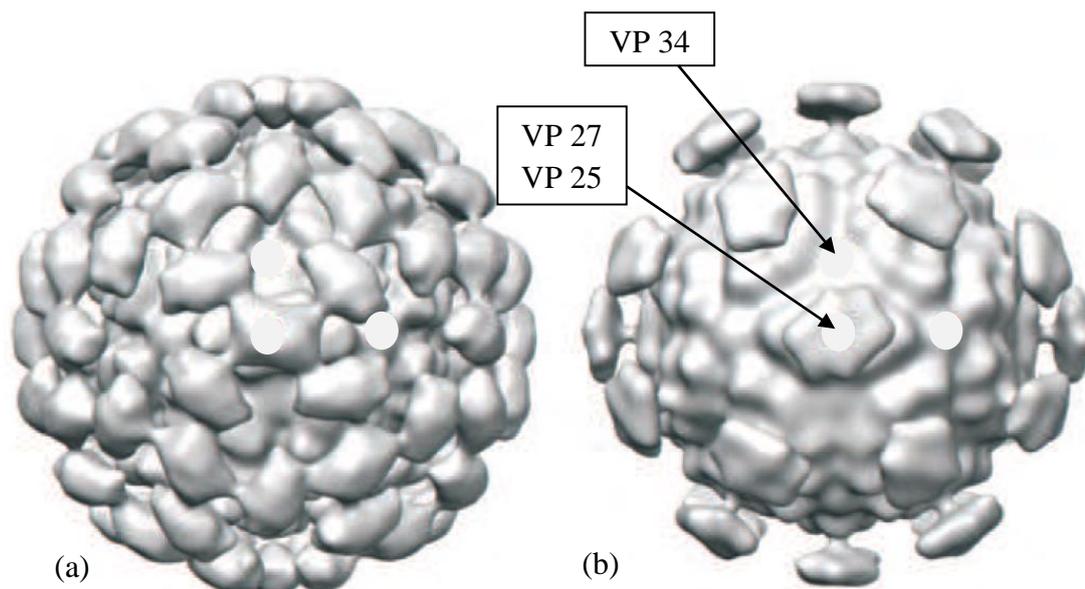


Figura 3. Reconstrução em terceira dimensão de vírions MAsTV1. (a) Sem tratamento de tripsina. (b) Com tratamento de tripsina. VP 34 constitui o cerne do capsídeo e VP 27 e VP 25 constituem as projeções estelares do capsídeo. Adaptado de Méndez e Arias (2013).

2.4 Organização Genômica e Biologia dos Astrovírus

Os AstVs têm genoma de RNA de fita simples linear, de sentido positivo, variando em tamanho de 6,17 *kilobases* (kb) a 7,72 kb, excluindo a cauda poli A e a região 3' final (FINKBEINER; KIRKWOOD; WANG, 2008; FU et al., 2009). Em geral, os membros da família *Astroviridae* possuem genoma que caracteriza-se por conter duas regiões não-transcritas e três ORFs com tamanho variado de acordo com a espécie. As duas ORFs localizadas mais próximas a a região 5' do genoma, são denominadas como ORF1a e ORF1b, ambas codificam proteínas não estruturais que, devido a domínios conservados encontrados em suas sequências, estipula-se que estejam diretamente ligadas à transcrição e replicação do genoma viral. Além disso, ORF1a e ORF1b sobrepõem-se em uma larga extensão, variando em determinadas espécies, de forma que essa região de sobreposição contém sinais essenciais para a tradução da polimerase viral (codificada pela ORF1b), através de um mecanismo chamado de *frameshift* (troca de fase de leitura) (JIANG et al., 1993). Por fim, a terceira ORF, encontrada mais próxima a região 3' do genoma viral, designada como ORF2, codifica a proteína estrutural do capsídeo viral (Figura 4).

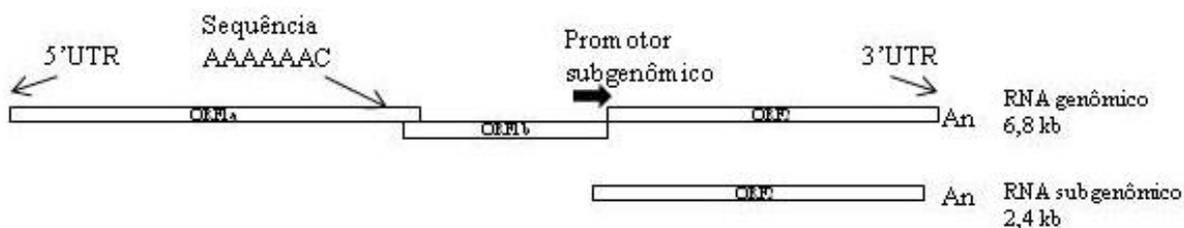


Figura 4. Representação esquemática da organização genômica do *astrovirus*. Os *astrovirus* são vírus RNA fita simples de polaridade positiva. Apesar da variabilidade genética entre a família, a estrutura genômica é similar entre seus representantes. Para o MAstV-1, o tamanho do genoma é de 6,8 *kilobases* (kb). Contendo uma região 5' não traduzível (UTR) de 85 nucleotídeos (nt), uma 3' UTR de 83 nt seguida de uma cauda poli-adenilada (An). Após a entrada do vírus na célula hospedeira a ORF1a é imediatamente traduzida para produzir proteínas não estruturais. A combinação de uma sequência AAAAAAC e uma estrutura secundária sinalizadora contribuem para o mecanismo de *frameshift*, resultando na tradução da ORF1ab e expressão do gene da proteína não estrutural RNA polimerase dependente de RNA. O RNA subgenômico tem 2,4 kb de comprimento e contém uma 5'UTR, 3'UTR seguida de uma cauda poli-adenilada (An) e é transcrito através de um promotor interno contido em sua fita de RNA. A ORF2 é traduzida através deste RNA subgenômico, produzindo a proteína estrutural do capsídeo viral.

Adaptado de Benedictis (2011).

O polipeptídeo codificado pela ORF1a tem, na maioria dos MAstV, de 874 a 936 aminoácidos (aa). Conforme predições de similaridade, esta proteína não estrutural possui cinco a seis domínios, denominadas hélices transmembranares, seguidos por um domínio da serino-protease viral (v-Pro) (JONASSEN et al., 2003). A v-Pro tem similaridade molecular com uma enzima tripsina, porém com uma serina no terceiro resíduo de aminoácido catalítico (SPERONI et al., 2009). Duas hélices enroladas, do termo em inglês *coiled-coil* (CC), estão presentes na extensão da ORF1a, sugerindo função regulatória da expressão do gene (JONASSEN et al., 2003). Ademais, inserções e deleções ao longo da sequência foram descritas, atuando na eficiência da síntese do RNA viral, como também na adaptação à culturas celulares (GUIX et al., 2005; WILLCOCKS et al., 1994).

Dada a existência de uma provável proteína viral genômica (VPg), a ausência da metiltransferase poderia ser entendida; no entanto, a falta de um domínio de RNA helicase seria incomum para um vírus RNA polaridade positiva com genoma maior que 6000 nucleotídeos (nt), como são os *astrovirus* (JIANG et al., 1993). Além disso, a polimerase dos *astrovirus* é classificada no supergrupo 1, um grupo que utiliza oligonucleotídeos codificados pelo vírus para iniciar a tradução (JANG et al., 2010; LEWIS et al., 1994).

A segunda região aberta de leitura (ORF1b) dos *astrovirus*, que codifica a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), sobrepõe a ORF1a e é transcrita através do mecanismo de *frameshift*, considerado usual entre os vírus RNA polaridade positiva

(LEWIS; MATSUI, 1995). Potenciais regiões codificantes da RNA helicase e da metiltransferase ainda não foram identificadas no genoma do *astrovirus* (JIANG et al., 1993) (Figura 5).

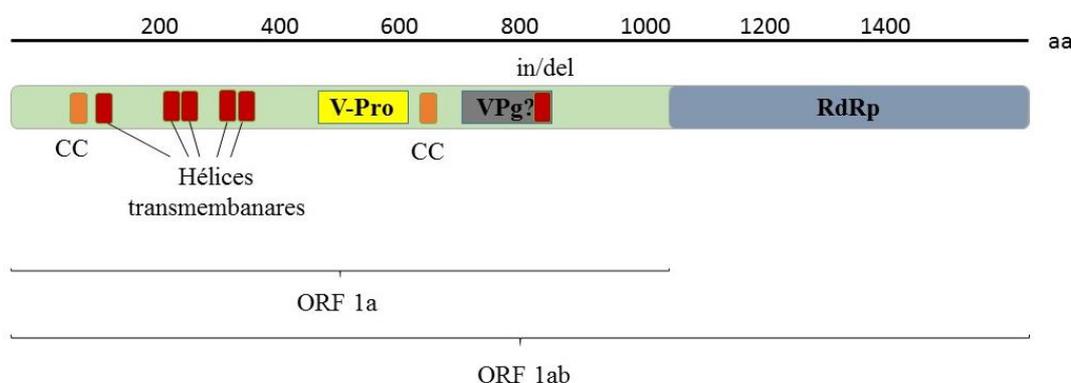


Figura 5. Representação esquemática das prováveis proteínas estruturais sintetizadas pela ORF1a e ORF1ab. Contendo dois domínios *Coiled-Coil* (CC), até seis hélices transmembranares, uma serino protease viral (V-Pro), uma provável proteína viral genômica (VPg?) e a RNA polimerase RNA dependente (RdRp).

Adaptado de Méndez e Arias (2013).

A maior variabilidade genômica do *astrovirus* encontra-se na ORF2, que codifica a proteína estrutural do capsídeo viral. A porção N-terminal dessa proteína é mais conservada em comparação à porção C-terminal. Deste modo, mantém conservadas características básicas comuns a todos os *astrovirus* e estipula-se que seu arranjo molecular seja oriundo da interação com o RNA empacotado do vírion (GEIGENMU et al., 2002). Por outro lado, a porção C-terminal da proteína apresenta considerável variabilidade entre os *astrovirus* (JONASSEN et al., 2001; WANG et al., 2001). Portanto, os domínios mais conservados da região N-terminal formam o cerne do capsídeo (camada interna), enquanto que as regiões mais variáveis dão origem às projeções estelares típicas desta família. Outrossim esse domínio creditasse participar das iniciais etapas de interação com a célula hospedeira (Figura 6).

O capsídeo viral dos *astrovirus* tem propriedades biológicas singulares. Porquanto, foi demonstrado ser capaz de inibir a via clássica e a via da lectina do complemento pela sua ligação à proteína C1 (C1q) e ligação à lectina ligadora de manose (MLB), respectivamente (HAIR et al., 2010). Outra particular propriedade é sua virtual ação como uma enterotoxina, rompendo o complexo de junções intracelulares e por consequência, aumentando a permeabilidade da barreira epitelial. Esse processo ocorre independente da replicação viral, podendo assim auxiliar no estabelecimento do quadro de diarreia (MOSER; CARTER; SCHULTZ-CHERRY, 2007).

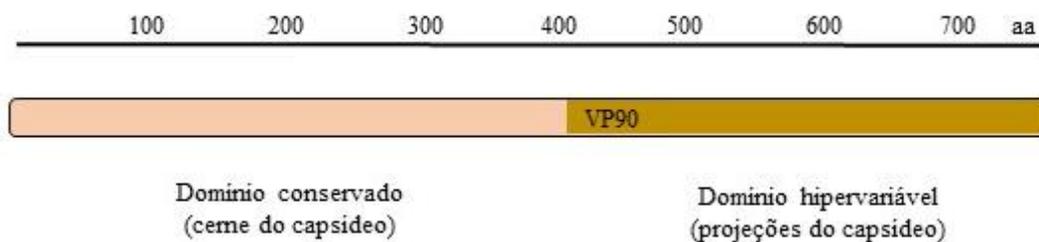


Figura 6. Característica da proteína estrutural VP90 do capsídeo viral. O produto primária da ORF2, denominado VP90, contém dois domínios que podem ser distinguidos através de seu grau de conservação: o domínio hipervariável forma as projeções do capsídeo, enquanto o domínio conservado forma o cerne do capsídeo. Adaptado de Méndez e Arias (2013).

Até o presente momento, análises genéticas de sequências completas da ORF2 e parciais da ORF1b de AstVs infectivos de cães (MAstV5) identificaram uma sobreposição de 8 nt entre a região 3' da ORF1b e a região 5' da ORF2. Nas cepas analisadas, a extensão da ORF2 apresentou tamanho variável entre 765 a 774 aminoácidos, conforme a sequência apresentada na figura 6 (TOFFAN et al., 2009; MARTELLA et al., 2011; ZHU et al., 2011). Também foram observadas regiões altamente conservadas na extensão da sequência da ORF2, onde são encontrados promotores para a síntese do RNA subgenômico e um *motif* (s2m) compartilhado entre os *Mamastrovirus* (WALTER et al., 2001). O *motif* s2m é uma estrutura secundária do RNA genômico de função ainda não esclarecida, porém sugere-se que tenha função tanto na replicação viral, quanto no empacotamento do vírus.

Por comparação da proteína do capsídeo, pode ser observado mais de 70% de similaridade de aminoácidos entre sequências de AstVs infectivos de cães e menos de 33% de similaridade de aminoácidos a outros *astrovirus*, constituindo um grupo geneticamente definido (Tabela 1). Considerando a variação (< 50% identidade de aa) da porção C-terminal hipervariável, ocorrendo entre os resíduos de aminoácidos 422 e 668, estima-se poder haver significativas diferenças antigênicas entre as cepas de MAstV5 (MARTELLA et al., 2011).

AstV	Italy/05	Bari/08/ITA
Human type 1	34.1	33.6
Human type 2	33.2	34.0
Human type 3	33.9	33.9
Human type 4	34.7	34.4
Human type 5	34.2	34.8
Human type 6	34.9	35.2
Human type 7	34.3	34.4
Human type 8	34.5	35.0
Human VA1	21.9	22.0
Human VA2	20.3	20.7
Human MLB1	22.2	21.9
Mink	22.7	23.0
Pig	35.2	35.0
CSL-1	20.3	20.1
CSL-2	35.1	35.6
Bottlenose dolphin	29.8	29.9
Bat type 1	20.7	20.3
Bat LC03	20.4	20.6
Bat LD38	20.4	20.6
Duck	16.9	16.3
Turkey type 1	15.1	15.2
Turkey type 2	16.7	17.1
Turkey type 3	17.3	17.3
Avian nephritis virus type 1	13.6	13.7
Dog Italy/05	100.0	83.5
Dog Bari/08/ITA	83.5	100.0

Tabela 1. Percentagem de similaridade de aminoácidos da proteína do capsídeo entre as cepas Italy/05 e Bari/08/ITA e demais espécies de *astrovirus*.

Fonte: (MARTELLA et al., 2011).

2.5 Replicação Viral

A dificuldade de isolamento em cultivo celular do *astrovirus* impossibilitou o avanço na sua caracterização, porém em 1981 foi demonstrada a produção efetiva de vírus em monocamada de linhagem celular epitelial renal humana (HEK), através de passagens com adição de tripsina (BRITAIN; LEE; KURTZ, 1981). Essa dificuldade estendeu-se para outras diversas cepas, como as cepas de MAstV5. No entanto, estudo realizado na Itália obteve sucesso ao isolar em linhagem celular renal canina (MDCK) o MAstV5 de amostras fecais de filhotes de cães, apresentando quadro de gastroenterite viral, negativos para os demais patógenos virais caninos conhecidos, como: CPV-2, CCoV, vírus da cinomose canina (CDV), entre outros. O efeito citopático observado foi de alargamento e/ou desprendimento do tapete celular e do aparecimento de grânulos no citoplasma (MARTELLA et al., 2011) (Figura 7).

Portanto, o conhecimento acerca dos MAstV5 que infectam cães ainda é insuficiente e pouco se sabe sobre o processo de adsorção e entrada na célula hospedeira, como também sobre os receptores virais que propiciariam a entrada do vírus. Alternativamente, a informação aqui dissertada sobre a replicação do AstV será inferida de estudos com AstVs que infectam humanos e de amplo material de outros vírus de RNA polaridade positiva, incluindo alfavírus e picornavírus (BENEDICTIS et al., 2011).

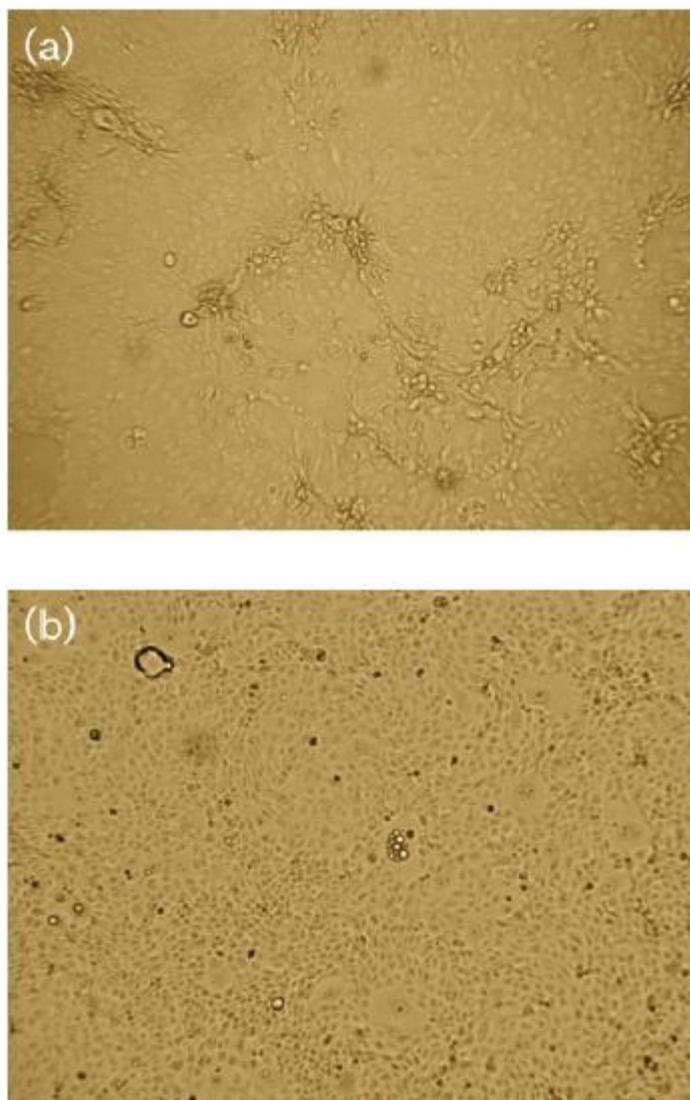


Figura 7. (a) Fotografia do efeito citopático induzido pela replicação do MAstV5 em células MDCK. (b) Controle negativo. Microscopia ótica em aumento de 10x.

Fonte: (MARTELLA et al., 2011).

A infectividade do *astrovirus* apresenta aumento quando esse é tratado com tripsina (BASS; QIU, 2000); porém, o processo pelo qual o tratamento lança mão para ter esse ganho de infectividade do vírion ainda é desconhecido. A clivagem pela tripsina produz uma drástica alteração estrutural da poliproteína do capsídeo (VP70), gerando três proteínas menores (VP34, VP27 e VP25) (Figura 3). A VP34 constitui o cerne do

capsídeo enquanto a VP27 e a VP25 formam as projeções que interagem com a célula do hospedeiro (BASS; UPADHYAYULA, 1997).

A entrada do vírus na célula hospedeira se dá pela via endocítica, denominada endocitose mediada por receptores (DONELLI et al., 1992). A interação com a célula hospedeira acarreta na ativação da via de sinalização ERK1/2, requerida para estabelecer uma infecção produtiva, visto que o bloqueio desta quinase demonstrou inibição da síntese de RNA e proteína viral, conseqüentemente diminuiu a produção viral (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

Os mecanismos pelos quais o RNA genômico viral é liberado da partícula viral para dentro do citoplasma celular para a sua tradução, bem como o sítio celular onde isso ocorre, e as etapas celulares e virais, envolvendo esse evento, ainda são desconhecidas (MÉNDEZ; ARIAS, 2013). Entretanto, sabe-se que, uma vez que o vírion é internalizado, a ORF1a e 1b são imediatamente traduzidas pela maquinária celular. Os polipeptídios gerados contêm várias regiões conservadas, incluindo até cinco prováveis hélices transmembranares, *coiled coil motif* e a serino protease (v-Pro). Posteriormente, o polipeptídio traduzido é clivado por ambas as proteases (celulares e virais) em, no mínimo, cinco peptídeos (GUIX et al., 2005) (Figura 8).

A ORF1b que codifica a polimerase RNA dependente de RNA (RdRp) é traduzida através de um mecanismo denominado *frameshift*, comum entre os vírus de RNA polaridade positiva. A tradução forma uma sequência heptamérica altamente conservada (A₆C) e uma estrutura em *hairpin* logo a seguir (LEWIS; MATSUI, 1995, 1996, 1997) (Figura 4). Após estas etapas iniciais, a transcrição genômica tem início, com a polimerase do *astrovirus* valendo-se de oligonucleotídeos codificados pelo próprio vírus (VPg) para iniciá-la (JANG et al., 2010; LEWIS; MATSUI, 1995).

A expressão da RdRp resulta na produção de múltiplas cópias de sequências de RNA subgenômicas de polaridade positiva e poli-adeniladas (sgRNA), contendo pequenas porções não traduzíveis e a ORF2 (MONROE et al., 1993). A síntese da proteína do capsídeo através de um sgRNA molde retarda sua produção no ciclo da replicação viral, permitindo que, posteriormente, a tradução da ORF2 tenha acesso a doze vezes mais moldes para síntese do polipeptídio precursor do capsídeo (MONROE et al., 1993) (Figura 9).

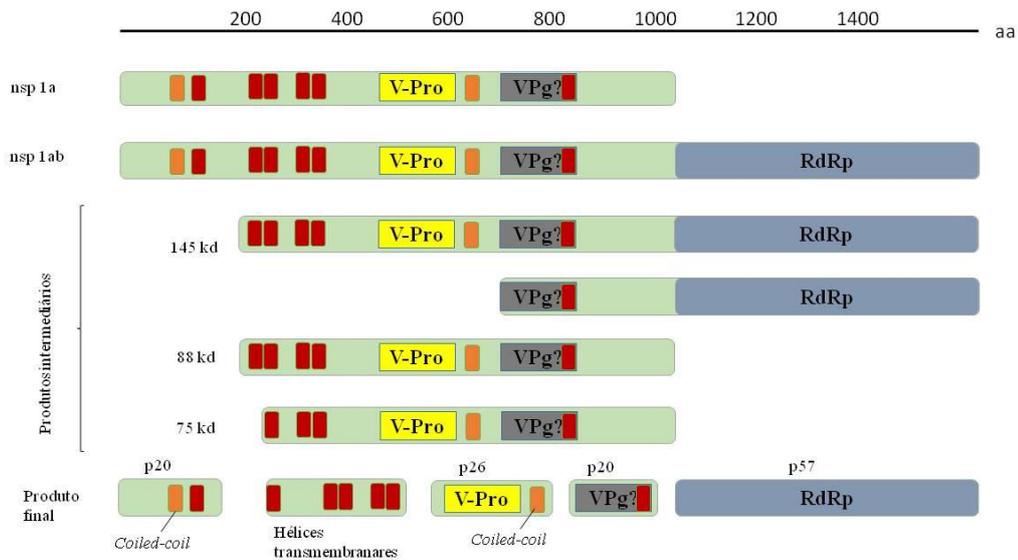


Figura 8. Processamento das proteínas não estruturais. As proteínas não estruturais (nsp1a e nsp1ab) são clivadas por proteases virais e celulares em pelo menos cinco peptídeos.

Fonte: (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

Até o presente momento, poucos estudos foram realizados enfocando a síntese RNA do *astrovirus* para a sua replicação. Considerando a estrutura e a organização genômica, presume-se que esses vírus seguem estratégias replicativas similares aos alfavírus (MÉNDEZ; ARIAS, 2013). Baseado nisso, o RNA genômico viral é usado como molde para a produção de um RNA polaridade negativa (gRNA-), que por sua vez serve tanto como molde para a produção da sequência completa do RNA genômico viral, como para a síntese do sgRNA molde (MÉNDEZ; ARIAS, 2013). Moléculas como a v-Pro, RdRp, VP90, gRNA(-) e inclusive partículas virais completas já foram observadas associadas com membranas celulares internas, devido a isto pode ser estipulado que a replicação do RNA viral e os primeiros passos da morfogênese são conduzidos provavelmente dentro do retículo endoplasmático (GUIX et al., 2004). Estudos não tiveram sucesso em reproduzir o empacotamento da partícula viral, tanto por produzirem estruturas instáveis e atípicas morfológicamente, quando purificadas, quanto por essas partículas não serem infectivas (CABALLERO et al., 2004; MOSER; CARTER; SCHULTZ-CHERRY, 2007). Porém, acredita-se que os produtos primários da ORF2, a VP90, formam partículas intracelulares associadas à estruturas de membrana celular, aonde as proteínas não estruturais do vírus e o RNA genômico viral são encontrados (MÉNDEZ et al., 2007). Já no citoplasma, o processo de proteólise das VP90 associado as partículas virais é conduzido por caspases, produzindo assim VP70, essencial para o

24,5% de 110 amostras de fezes coletadas de cães sintomáticos e 9,3% de 75 cães assintomáticos foram positivas para a presença de RNA de MAstV5. No mesmo estudo, pesquisa sorológica indicou que 59% de 54 cães testados tinham anticorpos específicos para MAstV5 (MARTELLA et al., 2011). Em trabalho similar realizado na França, detectou-se 43% de canis com a presença do vírus e uma maior susceptibilidade de filhotes menores que sete semanas de vida (GRELLET et al., 2012).

A excreção viral foi detectada por RT-PCR até o décimo dia pós infecção em um filhote de três meses hospitalizado com um quadro de diarreia aquosa e severa desidratação. Testes para a detecção de patógenos caninos comuns ao quadro clínico apresentado foram negativos, sugerindo que os sinais foram induzidos pela infecção do MAstV5 (MARTELLA et al., 2011). Através da quantificação da excreção viral por meio de teste de RT-qPCR, a correlação positiva entre os sinais clínicos e a titulação viral foi observada com alta descarga viral ocorrendo durante a fase aguda da infecção, como também, IgGs foram detectadas no soro do filhote duas semanas após hospitalização, indicando soroconversão (MARTELLA et al., 2011). Interessantes suposições sobre a patogenia da astrovirose canina foram descritas, quando monitorou-se um surto em dois cães que moravam juntos na mesma casa, causado pela cepa ITA/2010/Zoid. Essa cepa possui identidade limitada com os demais isolados caracterizados (entre 70,3% a 73,9%), analisando-se a completa sequência de aminoácidos do capsídeo. Além disso, anticorpos específicos para o protótipo do MAstV5 cepa ITA/2008/Bari, não foram detectados no soro desses animais, indicando a evidência de sorogrupos não relacionados entre a espécie MAstV5 (MARTELLA et al., 2012). Do mesmo modo, houve correlação entre a severidade dos sinais clínicos apresentados e a prolongação da excreção viral. Dessa maneira, prolongadas excreções virais após infecções agudas e a resistência a condições ambientais podem ser fatores essenciais para a difusão do vírus entre a população de cães susceptíveis (MARTELLA et al., 2011).

2.7 Diagnóstico

Os *astrovirus* têm sido detectados pela microscopia eletrônica direta em amostras de fezes. A sensibilidade dessa metodologia é estimada em 10^6 a 10^7 partículas virais por grama de amostra. Habitualmente, pacientes com diarreia infectados por *astrovirus* excretam grande quantidade de vírus, estimada em 10^{10} a 10^{11} partículas virais por grama de fezes (GUIX et al., 2005). Entretanto, naqueles que não excretam grande quantidade, faz-se utilização de outros métodos de detecção viral (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

Um ensaio de imunoenzimático (ELISA), com base em anticorpos monoclonais para o epítipo da proteína do capsídeo do MastV 1 sorotipo 1 ao 8, foi configurado para a detecção do vírus nas fezes de pacientes com gastroenterite. Em comparação com a microscopia eletrônica, usada como teste padrão, a sensibilidade do ELISA foi de 91% e a especificidade de 96%. Os resultados demonstram que o teste proporciona um meio sensível e específico para o diagnóstico de MastV 1 (HERRMANN et al., 1990). Contudo, os anticorpos monoclonais desenvolvidos por Herrmann (1990), não reconhecem as cepas de *Mamastrovirus* recentemente detectadas. Portanto, um teste sorológico de imuno fluorescência indireta, utilizando à cepa Bari/08/ITA como antígeno, está sendo desenvolvido por um grupo de pesquisa italiano, visando à identificação de IgGs (imunoglobulina G) específicas para o MAstV5 que infecta caninos (MARTELLA et al., 2011).

Maiores informações sobre a sequência de nucleotídeos dos *astrovirus* permitiram o desenvolvimento de técnicas moleculares para a sua detecção. Atualmente, as sequências do genoma completo de várias espécies de *mamastrovirus*, bem como as sequências da ORF2 de um elevado número de cepas, foram caracterizadas (MARTELLA et al., 2011). A alta variabilidade das sequências existentes entre estes vírus não permite a utilização de oligonucleotídeos iniciadores universais para todos os membros da família *Astroviridae*. No entanto, com base nessas sequências, a partir de oligonucleotídeos, regiões do genoma selecionadas foram utilizadas como alvo para diagnosticar MAstV de mesma espécie por RT-PCR (MÉNDEZ; ARIAS, 2013). Dado que diferentes patógenos são associados à infecções entéricas em seres humanos e animais, métodos baseados na RT-PCR têm sido desenvolvidos para o diagnóstico dessas múltiplas infecções virais em um único teste, incluindo o *astrovirus* (BEURET, 2004; ROHAYEM et al., 2004; YAN et al., 2003).

Por fim, a análise metagenômica revelou a existência de novos *astrovirus* em amostras provenientes de pacientes com doenças não associadas a esses vírus previamente (KAPOOR et al., 2009; QUAN et al., 2010), permitindo à comunidade virologista maior entendimento do seu comportamento patobiológico e relevância clínica. Esta poderosa tecnologia pode ajudar a identificar *astrovirus* emergentes, assim como *astrovirus* comensais que, devido à especificidade dos testes convencionais, não eram detectados (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

2.8 Controle

Pelo fato da recente caracterização do MAstV5 e as incertezas sobre sua patogenia, como também a sua importância como agente primário da doença; a inferência sobre mecanismos de controle e profilaxia do MAstV5 são extremamente escassos. Porém, tomando como referência outros estudos sobre a família *Astroviridae*, a interrupção da transmissão é a chave para a prevenção da infecção (MOSER; SCHULTZ-CHERRY, 2005). Consequentemente, é de especial importância a precaução em locais de risco como canis, hotéis, clínicas e hospitais veterinários, onde a transmissão direta pode ocorrer, assim como o cuidado com filhotes entre cinco e sete semanas de vida, evitando locais de aglomerações de animais (GRELLET et al., 2012).

Os *astrovirus* são resistentes a diversos tratamentos, incluindo desinfetantes comuns utilizados rotineiramente, podendo resistir na água após tratamento de cloração. Além disso, não existe vacina disponível para proteção e controle da infecção. Por isso, procedimentos universais de higiene devem ser aplicados e reforçados diante desse cenário (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Detection and characterization of *mamastrovirus 5* in Brazil

Detection and characterization of *mamastrovirus 5* in Brazil

**Christian Diniz Beduschi Travassos Alves¹, Renata da Fontoura Budaszewski¹,
Marcela Torikachvili¹, Oscar Fernando Ortiz Granados¹, André Felipe Streck¹,
Cláudio Wageck Canal^{1*}**

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author:

Cláudio Wageck Canal

Tel.: +55 51 33086926 – Fax: +55 51 33087305

E-mail address: claudio.canal@ufrgs.br (C.W.Canal).

Abstract

Mamastrovirus 5 (MAstV5, previously known as *canine astrovirus*) or astrovirus-like particles in dogs have been reported in several countries. In the present study, rectal swab samples were collected from 269 dogs for different regions of Brazil from 2008–2014, and 26.39% of the samples were MAstV5 positive by two RT-PCR protocols. Four positive samples were sequenced and displayed low similarity (< 85%) with capsid genes of another MAstV5. The present work is the first to present an overview of MAstV5 circulating in Brazil. The characterization of the Brazilian strains revealed a remarkable genetic heterogeneity of MAstV5, which may require a novel classification of the species among two genotypes.

Introduction

Viruses belonging to the family *Astroviridae* are spherical, non-enveloped and have 28–30 nm in size with its surface forming a characteristic star-like structure (Madeley and Cosgrove, 1975). The viral classification was previously based on the hosts from which they were usually found and consisted of two genera, *Avastrovirus* (three species) and *Mamastrovirus* (nineteen species); however, recent characterization of novel astroviruses (AstV) has shown that isolates from different animal species can be genetically similar, while genetically diverse viruses can be isolated from the same animal species. Based on this knowledge, phylogenetic analysis of the full length amino acid sequence of the mamastroviruses ORF2 (which encodes the capsid protein) results in 19 groups or species. Amino acid genetic distances (p-dist) range between 0.378–0.750, and 0.006–0.312 between and within groups, respectively. In this system, *canine astrovirus* are denominated *mamastrovirus 5* by the International Committee on Taxonomy of Viruses, ICVT (Bosch et al., 2011).

The genome of AstV range from 6.8 to 7.9 kb in size, is polyadenylated at the 3' end and contain three ORFs designated ORF1a, ORF1b and ORF2. ORF1a encodes the non-structural polyprotein 1a, whilst the entire ORF1 encodes both a protease and the RNA dependent RNA polymerase, with a ribosomal frame shift at the ORF1a/1b junction (De Benedictis et al., 2011; Jiang et al., 1993). The ORF2 encodes the viral capsid structural polyprotein required for virion assembly (Monroe et al., 1993).

Astroviruses (AstVs) have been detected in faecal samples from a wide variety of mammals and birds associated with gastroenteritis (De Benedictis et al., 2011). In children, AstV have been determined to be the second most common cause of gastroenteritis after rotaviruses (De Benedictis et al., 2011; Finkbeiner et al., 2009).

Human AstVs can also cause significant disease in the elderly (Lewis et al., 1989) and in immune-compromised patients (Gallimore et al., 2005; Wunderli et al., 2011). In addition to enterical manifestations, AstVs have been associated with fatal hepatitis in ducks (Fu et al., 2009), interstitial nephritis in young chickens (Imada et al., 2000), stunting and pre hatching mortality in duck and goose embryos (Biđin et al., 2012). Recently, an AstV was shown to be the causative agent of encephalitis in a 15-year-old boy with agammaglobulinaemia (Quan et al., 2010), also a shaking mink syndrome (Blomström et al., 2010).

Since the 1980s, astrovirus-like particles have been reported in dogs with and without diarrhea (Marshall et al., 1984; Vieler and Herbst, 1995; Williams, 1980). To date, canine astroviruses or astrovirus-like particles in dogs have been reported in several countries (Castro et al., 2013; Grellet et al., 2012; Marshall et al., 1984; Toffan et al., 2009; Vieler and Herbst, 1995; Williams, 1980; Zhu et al., 2011); however, the association of MAstV5 with clinical disease remains obscure. Moreover, MAstV5 was already detected in symptomatic animals co-infected with other enteric viruses, such as rotaviruses (Toffan et al., 2009) and corona- and/or parvoviruses (Martella et al., 2011; Williams, 1980). In the present study, we investigated the presence of the MAstV5 in 269 fecal samples from dogs of different ages with and without diarrhea by RT-PCR and sequenced partial genomes of selected MAstV5 RNA-positive samples to characterize the genome features of these sequences that is not known in Brazil.

Materials and methods

Samples

A total of 269 faecal samples from dogs were collected between 2008–2014 in veterinary clinics and hospitals. These samples originally came from eight Federal

States of Brazil (Acre, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Rondônia, Santa Catarina and São Paulo). The age of the animals ranged from puppies (less than one year old) to adult dogs (more than one year old), including some samples from dogs of unknown age (Table 1). Animals not presenting clinical signs at the time of sampling were considered asymptomatic. Samples were diluted to 20% (w/v) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) and stored at -80°C for further analysis.

RNA extraction and reverse transcriptase

Viral RNA was extracted using TRIzol® LS Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized with SuperScript®III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) using the reverse primers in a total volume of 20 μL following the manufacturer's recommendations.

Primers

An initial screening allowing the detection of a larger number of *Mamastrovirus* species was achieved by the amplification of a 422 bp of the ORF1b fragment, using primers described previously (Chu et al., 2008) (Figure 1a). Briefly, a hemi-nested RT-PCR protocol with outer primers ASTRO 2F, ASTRO 6F and ASTRO 3R were used for the first round of amplification, and ASTRO 4F, ASTRO 5F and ASTRO 3R were used as inner primers for the second round of amplification. For the specific detection of MAsV5, all the 92 available nucleotide sequences of this species were retrieved from GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and aligned using CLUSTAL W within Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6 (MEGA6) (Tamura et al., 2013). A primer pair targeting a conserved region of MAsV5 was selected using Primer3 software (Untergasser et al., 2007). The primers covered a

region of the second ORF and amplified a fragment of 250 bp (Figure 1a). For phylogenetic analysis, sets of primers were selected to amplify overlapping fragments of the partial ORF1 and the complete capsid protein. The primer sequences are shown in Table 2.

RT-PCR detection

For MAstV5 detection, hemi-nested RT-PCR for the amplification of 422 bp of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) gene was performed for initial screening and a RT-PCR using the specific primer pair for the amplification of 250 bp of the capsid protein gene was performed in all faecal samples. cDNA amplification was conducted in a final volume of 25 μ L containing 1 \times PCR buffer, 1.5 mM of MgCl₂, 2,5 mM of dNTP mix, 20 pmol/ μ L of each primer and 1 unit of Platinum®Taq DNA Polymerase (Life Technologies, Carlsbad, USA). The hemi-nested PCR was performed in a final volume of 25 μ L that contained 2 μ L of the first reaction product. First-round PCR was carried out with a mixture of two forward primers (ASTRO 2F and ASTRO 6F) and one reverse primer (ASTRO 3R). After an initial incubation at 94°C for 3 min, 30 cycles of amplification were carried out consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 50°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. Hemi-nested PCR was carried out with a mixture of two forward primers (ASTRO 4F and ASTRO 5F), and the same reverse primers used in the first-round PCR; the thermocycler conditions were the same as those used for the first-round PCR (ASTRO 3R). The PCR with specific primers was performed in 1 cycle at 94°C for 5 min; 25 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 58 °C for 30 s and polymerization at 72°C for 1 min; and a final extension cycle at 72°C for 7 min.

Genome amplification

Four positive samples were selected for the amplification of the OFR1a, OFR 1b and OFR2 sequences. For this reason, a set of primer pairs was selected to create overlapping segments that together represented a consensus sequence about 5000 nt. The amplification was performed by a nested touchdown PCR method using 12 sets of inner and outer primers described in Table 2. cDNA was synthesized with SuperScript III Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. The first round of amplification was conducted with an initial denaturation at 95°C for 5 min; 20 cycles of 30 s for denaturation at 95°C, 30 s for outer primer pair annealing at 55 to 45°C in a touchdown method, and 7 min of extension at 72°C; and a 7 min final extension at 72°C.. The second round of amplification was conducted with the temperature cycling consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min; 30 cycles of 30 s of denaturation at 95°C, 30 s of inner primer annealing at 55 to 45°C in a touchdown method, and 1 min of extension at 72°C; and a 7 min final extension at 72°C. The primer pairs were used in a nested PCR with Platinum® Taq DNA polymerase (Life Technologies, Carlsbad, USA)

Sequencing and phylogenetic analysis

The PCR products generated with the sets of inner primers were purified using the NucleoSpin Extract II kit (Macherey–Nagel, Düren, Germany). Both DNA strands were sequenced with an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer using a BigDye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Overlapping fragments were aligned and the contigs were assembled using SeqMan (DNASTAR package). Sequence alignment of the contigs was performed with MEGA6 (Tamura et al., 2013) software using CLUSTAL W algorithm. For phylogenetic analysis of the MAstV5 capsid protein region, four Brazilian MAstV5 sequences were selected from the positive samples based on the distinctly geographical regions of sampling, and

fifteen MAstV5 reference strains were included. MEGA6 (Tamura et al., 2013) was used for phylogeny inference by Maximum Likelihood. Kimura 2-parameter substitution model was selected for the MAstV5 ORF2 nucleotide inference and the LG substitution model (frequencies +F) for the amino acid inference. The rate of variation among sites was modeled with a gamma distribution (shape parameter= 5). Statistical support was provided by 1000 non-parametric bootstrap analyses. A nucleotide distance matrix was calculated using an alignment with ORF1b and ORF2 and partial genome sequences (Table 3). The MAstVs genotypes were distinguished based on the amino acid sequence of the full length ORF2, where the genetic distances (p-dist) 0.378-0.750, and 0.006-0.312 between and within group were used, respectively (Méndez and Monroe, 2011). All the sequence alignments used to construct the phylogenetic trees are available in Figshare (<http://figshare.com/>) with the DOI number XXX and the nucleotide sequences are available in GenBank, accession number XXX-XXX.

Results

Detection of MAstV5 and description of MAstV5-associated clinical signs

MAstV5 were detected in 26.39% (71/269) of the faecal samples. Details of the geographical origin of the MAstV5 samples are summarized in Table 1. Overall, most of the 71 positive samples were collected in Rio Grande do Sul (49.29%, 35/71), followed by Paraná (29.58%, 21/71), São Paulo (7.04%, 5/71), Mato Grosso do Sul (7.04%, 5/71), Santa Catarina (5.63, 4/71%) and Rio de Janeiro (1.40%, 1/71). In contrast, there was no MAstV5 detection in two states (Acre and Rondônia) (Table 1). Interestingly, 21 (29.58%, 21/71) of the 71 MAstV5-positive dogs were asymptomatic, whereas nineteen (26.76%, 19/71) displayed clinical signs suggestive of viral gastroenteritis. Information regarding clinical signs was unavailable for 31 animals.

Furthermore, MAstV5 were identified in 59.15% (42/71) of dogs with less than one year old and in 8.45% (6/71) of the adult dogs. Information regarding age was unavailable for 23 animals (Table 1).

MAstV5 partial genome sequences and phylogenetic analysis

Some of the positive samples were randomly selected for genome sequencing. The partial genomes of MAstV5_Sara/13/BRA, MAstV5_237/13/BRA, MAstV5_GRAV/13/BRA and MAstV5_5617/12/BRA were 4980, 5011, 5039 and 5012 nt (respectively) excluding the poly(A) tail and 5' untranslated regions (UTRs). All of the four partial genomes obtained possessed typical AstV organization with in the three predicted main ORFs, ORF1a, ORF1b and ORF2 (Figure 1a). Moreover, a 'shift heptamer' (AAAAAAC) followed by a stem-loop structure was present near the 3' end of ORF1a in all four genomes (Figure 1a). However, no transmembrane helices were predicted within the regions near the N terminal region of ORF1a of the four strains using the TMHMM server version 2.0. The characteristic YGDD motif within the RNA-dependent RNA polymerase was conserved in the middle of the predicted ORF1b of the four strains. The predicted ORF2 start codon of all four sequences appeared to have an optimal context (RNNAUGG, A/G in position -3 and G in position+4). However, the context of the start codons of ORF1a and OFR1b putatively is less favorable, with motifs of GAGATGA and AAGATGC, respectively. A stem-loop II-like motif, referred to as s2m was not detected in any sequence. Further genome sequence comparison revealed that MAstV5_Sara/13/BRA, MAstV5_237/13/BRA, MAstV5_GRAV/13/BRA and MAstV5_5617/12/BRA had higher identities with Chinese strains, about 96%, than Italian strains (Table 3). Because the low number of sequences available with the complete genes, identities between the genomes of other different countries strains wasn't possible. In addition, the amino acid sequences of

ORF2 of the Bari/2008_ITA and GLE/Dog/ITA/2010/Zoid strains showed lower identities of 77 and 84%, respectively, than Chinese strains (China/2008_SH15 and China/2008_SH8) with the sequences determined in this study (Table 3).

For comparison, phylogenetic analyses were carried out with the OFR2 partial and complete sequences at nucleotide and amino acid levels. The partial genome sequences of the MAstV5 obtained in the present study and those available in GenBank, taken together with selected *Mamastrovirus* references sequences from other species, generated two evolutionary trees (Figure 2). Forty-two references strains and four study sequences corresponding to the nineteen *Mamastrovirus* species were clearly delineated, with high bootstrap support in all of the tree (Figure 2a). In the clade of MAstV5, all the study sequences clustered with "Astrovirus dog faeces/Italy/2005" (GenBank: FM213330.1), even with low amino acid identity about 80% (Table 3). Consequently, these four sequences created one different group suggesting a new genotype. By pairwise comparison of the ORF2 nucleotide sequence, a high degree of identity was detected among the Brazilian type strains, ranging from 95% to 99% nucleotide identity. MAstV5_Sara/13/BRA, MAstV5_237/13/BRA, MAstV5_GRAV/13/BRA and MAstV5_5617/12/BRA showed a close relationship with Chinese's strains; but more distantly with the MAstV5_GLE/Dog/ITA/2010/Zoid and MAstV5_strain_Bari/2008_ITA strains from Italy, indicating the distinction of two sublineages among the MAstV5 species (Figure 2b).

Discussion

Mamastrovirus 5 is considered an important emerging gastroenteritis-associated virus infecting dogs. Several reports suggests actively dissemination and clinical association by molecular analysis detection (Castro et al., 2013; Grellet et al., 2012; Martella et al.,

2011; Toffan et al., 2009; Zhu et al., 2011). Furthermore, the prevalence studies of MAstV5 in China suggested that 12.02% (22/183) of the puppies showing clinical signs of diarrhea were positive for astrovirus by RT-PCR as compared to zero of the 138 healthy dogs (Zhu et al., 2011). In a study conducted in Italy, 24.5% of 110 stool samples collected from symptomatic dogs and 9.3% of 75 asymptomatic animals under survey tested positive for the presence of MAstV5 RNA (Martella et al., 2011). In the same study, serologic assay indicates that 59% of 54 dogs surveyed in Italy presented specific MAstV5-antibodies, detected almost exclusively in dogs aged more than 3 months old (Martella et al., 2011). Similar prevalence was found in France where 20.9% (66/316) of the puppies in 42% (14/33) of the breeding kennels surveyed were MAstV5 positive by RT-PCR (Grellet et al., 2012). In the same report, the authors observed that puppies less than 7 weeks old were especially susceptible to MAstV5 infection (Grellet et al., 2012). Here, following screening of overall faecal sample collection, 26.39% (71/269) of the animals were MAstV5 positive by molecular analyses and within the positive samples, the major detection was also found in puppies, about 59.15% (42/71), suggesting that the young dog population may play an important role in virus epidemiology. Nevertheless, there was no information regarding age on 32.39% (23/71) positive samples, hindering the confirmation of this assumption. The majority of MAstV5-infected dogs were also infected by other canine pathogens, such as CPV-2 42.25% (30/71) or CDV 38.02% (27/71), whilst single infections by MAstV5 were detected in 29.58% (21/71) and matches with the asymptomatic dogs (a comparison with other enterical viruses in these samples can be found in the study of Granados et al. (data not published). These findings are not unexpected, as mixed infections are not infrequent, and the evidence that MAstV5 can be present in asymptomatic dogs in the high occurrence contrary the act by themselves as the primary causative agent of

gastrointestinal disease. To elucidate the real pathogenic role of the MAstV5, experimental infections are necessary.

Partial genomic sequencing and characterization of selected samples revealed a remarkable genetic heterogeneity among MAstV5; the low identities (< 85 %) displayed between the capsid gene sequences may indicate the need of a novel classification among species in the two genotypes; since, it has been reported that if two strains of human AstV have less than 95% homology at the nucleotide level, they are serologically distinguishable (Walter et al., 2001). Additionally, phylogenetic analysis indicated that the four MAstV5 strains reported here represents a lineage more closely related to China strains than Italy strains, reflecting the ORF2 high identity (97%), according to the species demarcation criteria established ICTV (Bosch et al., 2011). Notably, the ORF1b sequence of MAstV5_Sara/13/BRA, MAstV5_237/13/BRA, MAstV5_GRAV/13/BRA and MAstV5_5617/12/BRA represents, theoretically, a more conserved region than the ORF2, but showed lowest similarity in this study.

Moreover, a 'shift heptamer' (AAAAAAC) followed by a stem-loop structure was present near the 3' end of ORF1a in all four genomes, which is a potential signal responsible for inducing ribosomal frame shift during translation to generate the replicase protein ORF1ab (Figure1) (Lewis et al., 1994). Whether the conserved heptamer (AAAAAAC), revealed with in the 3' termini of ORF1a, indicates a genetic marker for AstVs from different hosts or perhaps has an important function during virus replication also needs further investigation.

The optimal context for initiation of translation of RNNAUGG (A/G in position -3 and G in position+4), which has been reported to have the strongest positive effects on translation (Kozak, 1991). The predicted start codon of ORF2 of all four sequences

appeared to have an optimal context. However, the context of the start codons of ORF1a and ORF1b appeared to be less favorable, with motifs of GAGATGA and AAGATGC, respectively.

The characteristic YGDD motif within the RNA-dependent RNA polymerase was conserved in the middle of the predicted ORF1b of the four strains (Kamer and Argos, 1984; Poch et al., 1989). A conserved sequence (TTTGGAGNGGNGGACCNAAN₄₈ATGNC; start codon underlined) located at the junction of ORF1b and ORF2 (just before the start codon of ORF2) was proposed previously to be a regulatory element serving as a promoter for subgenomic RNA transcription (Méndez and Arias, 2013). In the present study, the four partial genomes (MAstV5_Sara/13/BRA, MAstV5_237/13/BRA, MAstV5_GRAV/13/BRA and MAstV5_5617/12/BRA) showed a similar conserved motif of TATGGAGGGGAGGACCAAAN₈ATGGC (N=A/T/C/G) (Fig. 1) with one difference, TATGG instead TTTGG.

A stem-loop II-like motif, referred as s2m and corresponding to a highly conserved RNA structure near the AstV ORF2 stop codon is suggested to have an important role in viral RNA replication and is conserved in infectious bronchitis virus and equine rhinovirus (Jonassen et al., 2001). This motif was not detected in any sequence, but the lack of s2m has also been reported in other MAstVs strains (Finkbeiner et al., 2008; Luo et al., 2011). The absence of this region in several sequences raises concern about the biologic role of the s2m motif and the efficacy of detection test targeting this genomic region as a conserved region to identified astroviruses (Xiao et al., 2013); however, it is possible that these strains form other secondary structures similar to s2m within a different region of their 3' end, as proposed previously (Luo et al., 2011). In opposite, the YGDD motif identified in all the strains sequenced in this work displayed a strong genetic marker for *Mamastrovirus* genera and it suggest an important role in the virus

biological cycle as a regulatory element serving as a promoter for subgenomic RNA transcription (Méndez and Arias, 2013).

Conclusion

The current study observed an active dissemination of MAsV5 in Brazil by molecular detection. In particular, the results revealed the existence of two genotypes of the currently known MAsV5 strains. Phylogenetic analysis indicated a remarkable genetic heterogeneity and the four MAsV5 sequences were more closely related, with particular high similarity, to strains detected in China.

References

- Biđin, M., Lojkić, I., Tišljarić, M., Biđin, Z., Majnarić, D., 2012. Astroviruses associated with stunting and pre-hatching mortality in duck and goose embryos. *Avian Pathol.* 41, 91-97.
- Blomström, A.L., Widén, F., Hammer, A.S., Belák, S., Berg, M., 2010. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4392–4396.
- Bosch, A., Guix, S., Krishna, N.K., Méndez, E., Monroe, S.S., Pantin-Jackwood, M., Schultz-Cherry, S., 2011. Family Astroviridae. In *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses (Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses)*, 9th ed. New York.
- Castro, T.X., Cubel Garcia, R.C.N., Costa, E.M., Leal, R.M., Xavier, M.D.P.T., Leite, J.P.G., 2013. Molecular characterisation of calicivirus and astrovirus in puppies with enteritis. *Vet. Rec.* 172, 557. doi:10.1136/vr.101566
- Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2008. Novel astroviruses in insectivorous bats. *J. Virol.* 82, 9107–9114.
- De Benedictis, P., Schultz-Cherry, S., Burnham, A., Cattoli, G., 2011. Astrovirus infections in humans and animals - Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Infect. Genet. Evol.* 11, 1529–1544. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.024
- Finkbeiner, S.R., Kirkwood, C.D., Wang, D., 2008. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. *J. Virol.* 5, 117.
- Finkbeiner, S.R., Li, Y., Ruone, S., Conrardy, C., Gregoricus, N., Toney, D., Virgin, H.W., Anderson, L.J., Vinjé, J., Wang, D., Tong, S., 2009. Identification of a novel astrovirus (astrovirus VA1) associated with an outbreak of acute gastroenteritis. *J. Virol.* 83, 10836–10839.
- Fu, Y., Pan, M., Wang, X., Xu, Y., Xie, X., Knowles, N.J., Yang, H., Zhang, D., 2009. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. *J. Gen. Virol.* 90, 1104–1108.
- Gallimore, C.I., Taylor, C., Gennery, A.R., Cant, A.J., Galloway, A., Lewis, D., Gray, J.J., 2005. Use of a heminested reverse transcriptase PCR assay for detection of astrovirus in environmental swabs from an outbreak of gastroenteritis in a pediatric primary immunodeficiency unit. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3890–4. doi:10.1128/JCM.43.8.3890-3894.2005
- Grellet, A., De Battisti, C., Feugier, A., Pantile, M., Marciano, S., Grandjean, D., Cattoli, G., 2012. Prevalence and risk factors of astrovirus infection in puppies from French breeding kennels. *Vet. Microbiol.* 157, 214–9. doi:10.1016/j.vetmic.2011.11.012
- Imada, T., Yamaguchi, S., Mase, M., Tsukamoto, K., Kubo, M., Morooka, A., 2000. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *J. Virol.* 74, 8487–93.

- Jiang, B., Monroe, S.S., Koonin, E. V., Stine, S.E., Glass, R.I., 1993. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10539–10543. doi:10.1073/pnas.90.22.10539
- Jonassen, C.M., Jonassen, T., Saif, Y.M., Snodgrass, D.R., Ushijima, H., Shimizu, M., Grinde, B., 2001. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. *J. Gen. Virol.* 82, 1061–1067.
- Kamer, G., Argos, P., 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res.* 12, 7269–7282.
- Kozak, M., 1991. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* 266, 19867–70.
- Lewis, D.C., Lightfoot, N.F., Cubitt, W.D., Wilson, S.A., 1989. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J. Hosp. Infect.* 14, 9–14.
- Lewis, T.L., Greenberg, H.B., Herrmann, J.E., Smith, L.S., Matsui, S.M., 1994. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. *J. Virol.* 68, 77–83.
- Luo, Z., Roi, S., Dastor, M., Gallice, E., Laurin, M.A., L'Homme, Y., 2011. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Vet. Microbiol.* 149, 316–323.
- Madeley, C.R., Cosgrove, B.P., 1975. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet* 2, 451–2.
- Marshall, J.A., Healey, D.S., Studdert, M.J., Scott, P.C., Kennett, M.L., Ward, B.K., Gust, I.D., 1984. Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. *Aust. Vet. J.* 61, 33–38.
- Martella, V., Moschidou, P., Lorusso, E., Mari, V., Camero, M., Bellacicco, A., Losurdo, M., Pinto, P., Desario, C., Bányai, K., Elia, G., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2011. Detection and characterization of canine astroviruses. *J. Gen. Virol.* 92, 1880–7. doi:10.1099/vir.0.029025-0
- Méndez, E., Arias, C.F., 2013. Astroviruses, in: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 609 – 628.
- Monroe, S.S., Jiang, B., Stine, S.E., Koopmans, M., Glass, R.I., 1993. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. *J. Virol.* 67, 3611–3614.
- Poch, O., Sauvaget, I., Delarue, M., Tordo, N., 1989. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 8, 3867–3874.
- Quan, P.L., Wagner, T.A., Briese, T., Torgerson, T.R., Hornig, M., Tashmukhamedova, A., Firth, C., Palacios, G., Baisre-de-Leon, A., Paddock, C.D., Hutchison, S.K., Egholm, M., Zaki, S.R., Goldman, J.E., Ochs, H.D., Lipkin, W.I., 2010. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 918–925.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Toffan, A., Jonassen, C.M., De Battisti, C., Schiavon, E., Kofstad, T., Capua, I., Cattoli, G., 2009. Genetic characterization of a new astrovirus detected in dogs suffering from diarrhoea. *Vet. Microbiol.* 139, 147–52. doi:10.1016/j.vetmic.2009.04.031
- Untergasser, A., Nijveen, H., Rao, X., Bisseling, T., Geurts, R., Leunissen, J. a M., 2007. Primer3 Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res.* 35, W71–74. doi:10.1093/nar/gkm306
- Vieler, E., Herbst, W., 1995. Electron microscopic demonstration of viruses in feces of dogs with diarrhea. *Tierarztl. Prax.* 23, 66–69.
- Walter, J.E., Briggs, J., Guerrero, M.L., Matson, D.O., Pickering, L.K., Ruiz-Palacios, G., Berke, T., Mitchell, D.K., 2001. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. *Arch. Virol.* doi:10.1007/s007050170008
- Williams, F.P., 1980. Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrheal stools of beagle pups. *Arch. Virol.* 66, 215–226.
- Wunderli, W., Meerbach, A., GÜngör, T., Guengoer, T., Berger, C., Greiner, O., Caduff, R., Trkola, A., Bossart, W., Gerlach, D., Schibler, M., Cordey, S., McKee, T.A., Van Belle, S., Kaiser, L., Tapparel, C., 2011. Astrovirus infection in hospitalized infants with severe combined immunodeficiency after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *PLoS One* 6, e27483. doi:10.1371/journal.pone.0027483
- Xiao, C.-T., Giménez-Lirola, L.G., Gerber, P.F., Jiang, Y.-H., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2013. Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. *J. Gen. Virol.* 94, 570–82. doi:10.1099/vir.0.048744-0
- Zhu, a L., Zhao, W., Yin, H., Shan, T.L., Zhu, C.X., Yang, X., Hua, X.G., Cui, L., 2011. Isolation and characterization of canine astrovirus in China. *Arch. Virol.* 156, 1671–5. doi:10.1007/s00705-011-1022-z

Factor	Co-factor	Mamastrovirus 5 positive % (n)	Total % (n)
Overall	Hemi-nested RT-PCR		
	RT-PCR	26.39% (71)	100% (269)
State	Rio Grande do Sul	49.29% (35)	
	Paraná	29.58% (21)	
	São Paulo	7.04% (5)	
	Mato Grosso do Sul	7.04% (5)	
	Santa Catarina	5.63% (4)	
	Rio de Janeiro	1.40% (1)	
	Acre	0.00% (0)	
	Rondônia	0.00% (0)	100% (71)
Age	< 360 days	59.15% (42)	
	> 360 days	8.45% (6)	
	ND	32.39% (23)	100% (71)
Gastroenteritis symptoms	Symptomatic	29.58% (21)	
	Asymptomatic	26,76% (19)	
	ND	43.66% (31)	100% (71)

Table 1. Summary of the history (age, state and gastroenteritis symptoms), presence of MAstV5 and concurrent infection in faecal samples obtained from 269 dogs originally from Brazil.

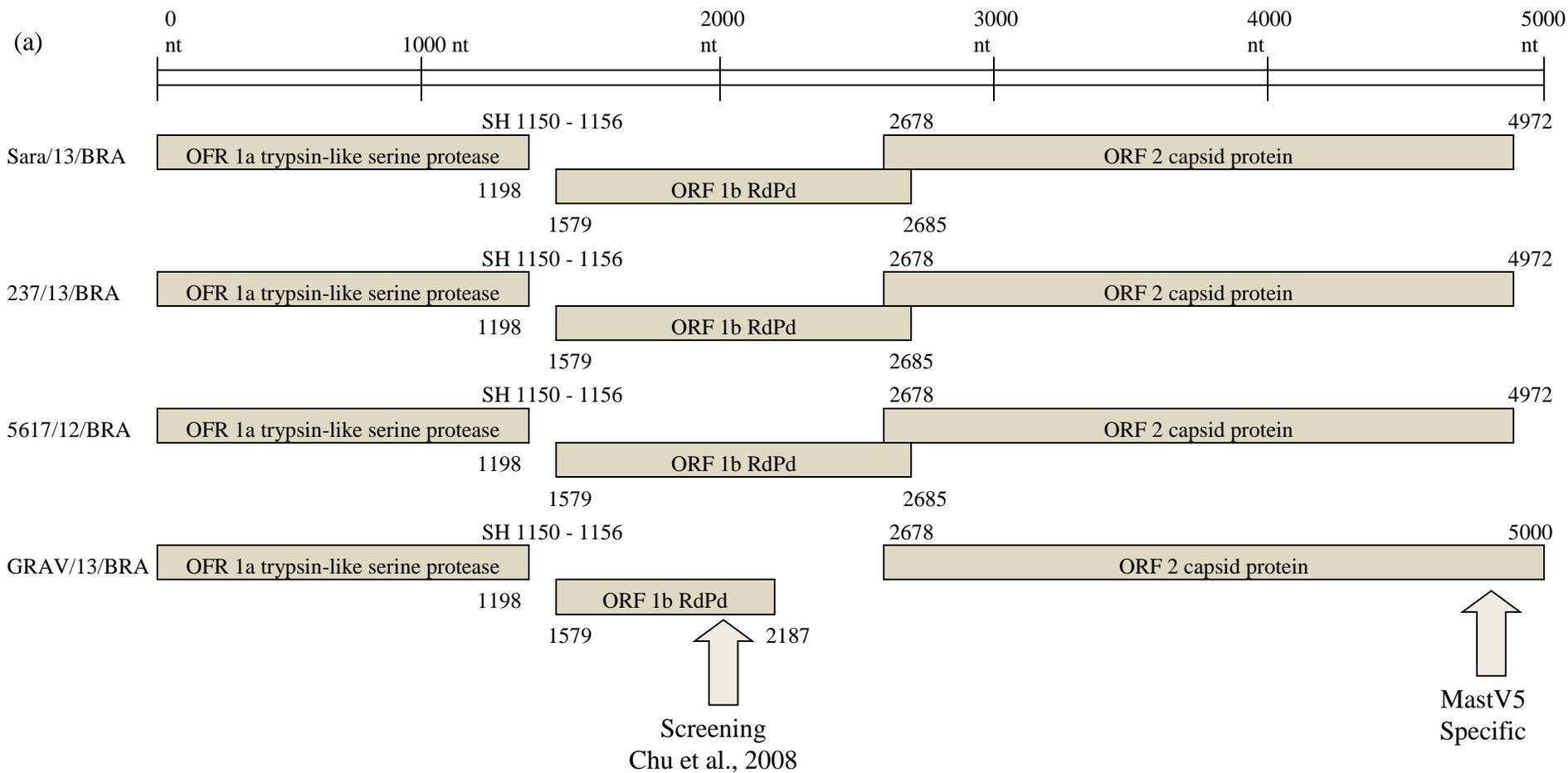
Oligonucleotide	Sequence (5' – 3')	Position	Methodology	Objective	Reference
ADS_138F	AATGTCACGGGATACCATC	ORF1a	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_230F	GTGCATCAAACCAACTGG	ORF1a	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_690R	GGGTCCTCCATTCAGGAAA	ORF1a	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_367F	CAAACCCCAACCTCAAGAGA	ORF1a	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_941R	CATCCTCAGCAGTCCAGTCA	ORF1a	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_719F	TGGGACACATATGGTGATGAA	ORF1a	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_1022R	GCCTAGGCTTGAGGATGTGA	ORF1a	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_922F	TGACTGGACTGCTGAGGATG	ORF1a	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_1606R	AGTCGGCTTCGGTGTCATAG	ORF1b	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_1317F	TGATCCGCTCAAATCCCTAC	ORF1b	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_1669R	TTGCTCCGGACATAATCCTC	ORF1b	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_1565F	CTGCCTATCCCAAGATGCTC	ORF1b	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_2192R	GCAAATTCAAAGCCTGGAG	ORF1b	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_2173F	CTCCAGGCTTTTGAATTTGC	ORF1b	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_2857R	ACTCTCTTGCGACCACGATT	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_2839F	ATCGTGGTCGCAAGAGAGTT	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_3535R	AGTGGTTGTCCTGCTTCACC	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_3415F	TTGAGCTTCACTGCACTTGG	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_4033R	CATGGTGGGTTCTGTTGGTA	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study

ADS_3963F	CCAGCTGTTATTGGGGACAA	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_4628R	TTGGTGGTGTCTGAGGAAA	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_4446F	GCCCCGGTTCATTTTTGT	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_5030R	TGAACCTGTACCCTCGATCC	ORF2	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ADS_TTTR	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	Poli A tail	Sequencing Nested RT-PCR Touchdown	Phylogenetic analysis	Present study
ASTRO 2	GARTTYGATTGGRCKCGKTAYGA	ORF 1b	Hemi-Nested RT-PCR	Screening	Chu et al., 2008
ASTRO 3	GGYTTKACCCACATNCCRAA	ORF 1b	Hemi-Nested RT-PCR	Screening	Chu et al., 2008
ASTRO 4	CGKTAYGATGGKACKATHCC	ORF 1b	Hemi-Nested RT-PCR	Screening	Chu et al., 2008
ASTRO 5	AGGTAYGATGGKACKATHCC	ORF 1b	Hemi-Nested RT-PCR	Screening	Chu et al., 2008
ASTRO 6	GARTTYGATTGGRCKAGGTAYGA	ORF 1b	Hemi-Nested RT-PCR	Screening	Chu et al., 2008
AstVCan For	TCTGATGATGATTCTCTTCTTGATG	ORF2	RT-PCR	MAstV5 specific detection	Present study
AstVCan Rev	GGGAACACTTTTCACGAGCA	ORF2	RT-PCR	MAstV5 specific detection	Present study

Table 2. Oligonucleotide sequences.

Strain	GenBank accession no. (genome size)	Sara/13/BRA (4980 nt, GB number)			5617/12/BRA (5012 nt, GB number)			GRAV/13/BRA (5039 nt, GB number)			237/13/BRA (5011 nt, GB number)		
		Partial Genome	ORF1b	ORF2	Partial Genome	ORF1b	ORF2	Partial Genome	ORF1b	ORF2	Partial Genome	ORF1b	ORF2
Bari/2008_ITA	HM045005.1 (3120 nt)	82	22	84	81	22	84	82	22	84	81	22	84
Italy/2005	FM213330.1 (2756 nt)	79	22	80	79	22	80	79	22	81	79	22	80
GLE/Dog/ITA/2010/Zoid	JN193534.1 (2949 nt)	76	20	77	76	20	77	75	20	77	76	20	77
China/2008_SH8	HQ623147.1 (2738 nt)	94	23	97	96	23	97	95	23	96	96	23	97
China/2008_SH15	HQ623148.1 (2738 nt)	94	23	97	96	23	97	95	23	96	96	23	97

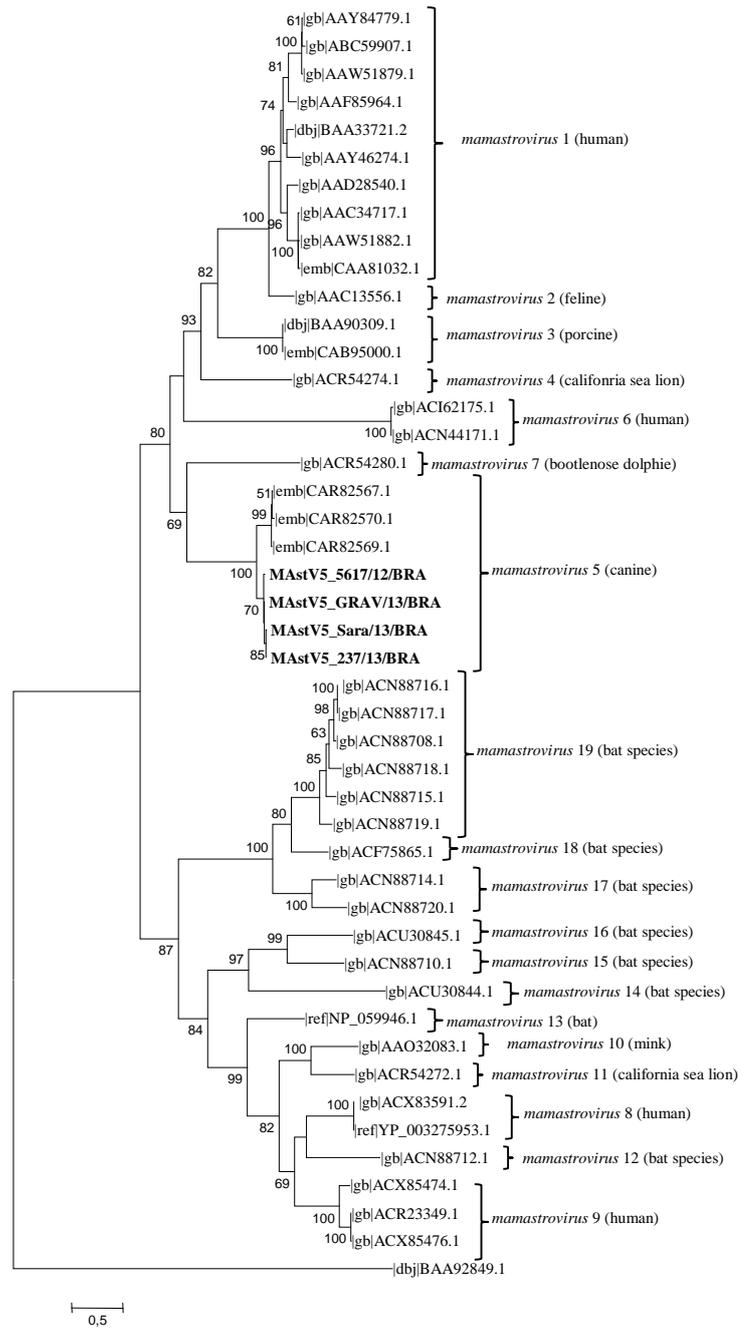
Table 3. Comparison of percentage nucleotide sequence identities of the partial genomes and percentage amino acid sequence identities of ORF1b and ORF2 of the sequenced MAsTV5 with sequences available in GenBank.

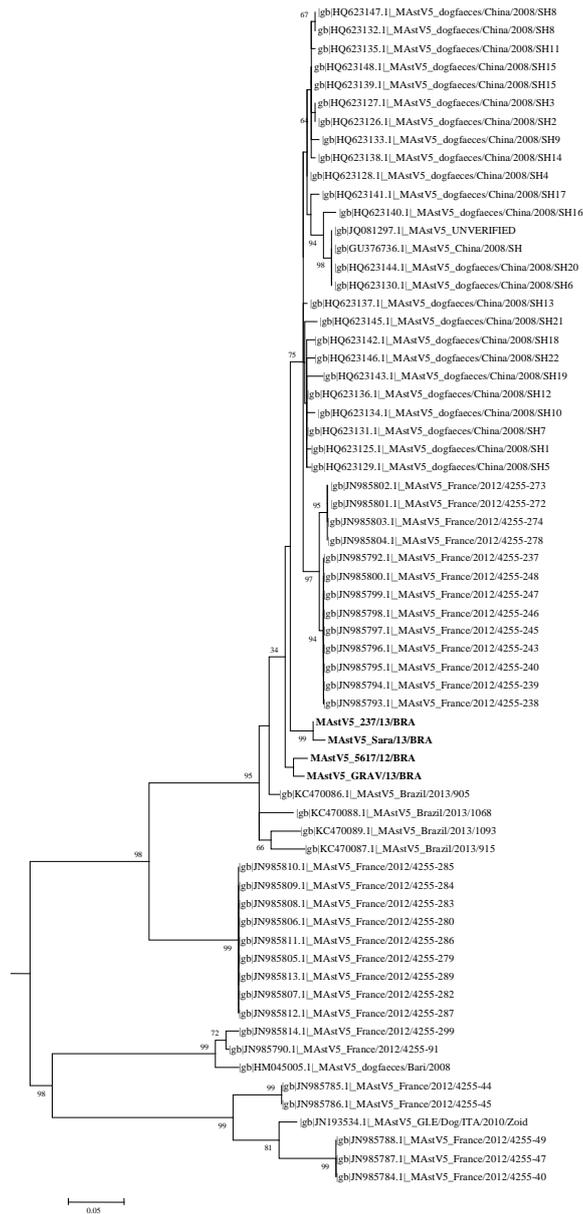


		▼		▼																																	
gb HM045005.1 Bari/2008	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A	
gb JN193534.1 GI.E/Dog/ITA/2010/Zoid	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A
gb JQ081297.1 UNVERIFIED: Dog astrovirus	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A	
gb HQ623148.1 SH8 China	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A	
HQ623147.1 China/2008	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A	
•5617/12/BRA.	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A	
•GRAV/13/BRA	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	C	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A	
•Sara/13/BRA	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A	
•237/13/BRA	A	T	A	T	G	G	A	G	G	G	G	A	G	G	A	C	C	A	A	A	A	A	A	A	T	T	G	C	G	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>C</u>	T	A	

Fig. 1. Putative features of the sequences obtained in the present study. (a) Schematic representation of the four novel partial M_{As}V5 genomes. Three predicated ORFs with their locations and sizes are indicated. SH, Slippery heptamer of AAAAAAC, location of the ribosomal frameshift signal and schematic representation positions of regions that were used for screening and specific detection of M_{As}V5. Numbering is according to the genome sequences obtained in this study. (b) Alignment of the conserved nucleotide sequences at the junction of ORF1b/ORF2. The location of the conserved sequences UUUGGAGNGGNGGACCNA A previously proposed to be a regulatory element serving as a promoter for subgenomic RNA transcription are indicated by ▼.

(a)





(b)

Figure 2. Evolutionary relationship of MAstV5 with representative MAstV genera. The percentage of replicates in which the associated virus clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) is shown next to the branches in each tree. The trees are drawn to scale; bars represent the number of substitutions per site. All positions except ambiguous positions were included. GenBank accession numbers are shown on the tree. MAstV5 sequences are shown in bold and those obtained in the present study are

indicated with a highlight color. (a) Evolutionary tree based on the complete amino acid sequences of the ORF2 gene (capsid) of 46 nucleotide sequences of AstVs. (b) Evolutionary tree based on the partialnucleotide sequences of the ORF2 of 51 sequences of MAstV5. The samples obtained in the present study are highlighted with a symbol (bold).

4 DISCUSSÃO

A astrovirose canina causada pelo *mamastrovirus* 5 é uma provável doença emergente entre os cães, associada à sintomatologia alusiva a uma gastroenterite aguda auto limitante em todos os casos relatados até o momento. O objetivo do trabalho foi detectar e caracterizar filogeneticamente o MAstV5 em amostras de fezes de cães sintomáticos e assintomáticos oriundos de vários estados brasileiros e comparar essas amostras a cepas da espécie MAstV5, como também à cepas de referência de outras espécies do gênero *Mamastrovirus* disponíveis em bancos de dados genômicos. Foi utilizada RT-PCR para a detecção e sequenciamento para posterior avaliação da variabilidade das cepas obtidas a campo.

Partículas AstV típicas foram observadas em amostras fecais de cães nos primeiros anos de 1980, mas somente recentemente a infecção de cães por *astrovirus* pôde ser confirmada e esses vírus caracterizados por via molecular, evidenciando uma espécie em particular, infectando cães denominada atualmente como *mamastrovirus* 5. Uma vez que a dificuldade de padronização do isolamento viral em cultivo celular, perante prováveis interações espécie-hospedeiro específicas, ainda hoje é fator limitante para o entendimento geral do MAstV5, deixando lacunas importantes a serem preenchidas.

Consequentemente, esse avanço no estudo do MAstV5 só foi alcançado posteriormente ao advento da biologia molecular e de novas técnicas de sequenciamento como o método de Sanger. Como exemplo desse avanço na pesquisa do *astrovirus*, recente mudança nos parâmetros de classificação foi elaborada em decorrência da heterogeneidade das cepas, adaptando a nova taxonomia e tornando-a mais coerente em relação as características biológicas dos vírus pertencentes a família *Astroviridae*.

No presente trabalho, a ocorrência de *astrovirus* infectando cães no Brasil foi estimada por dois métodos de RT-PCR. Devido ser o teste mais específico e sensível para a detecção de MAstV5 disponível, uma vez que, ao longo do tempo, ensaios imunológicos e o isolamento viral não se provaram testes eficazes em detectar o vírus, em decorrência da gama de variações genéticas presentes.

Levando isso em conta, diversos estudos sugerem ativa disseminação e associação clínica pela detecção utilizando análise molecular (TOFFAN et al., 2009; MARTELLA et al., 2011; ZHU et al., 2011; GRELLET et al., 2012; CASTRO et al., 2013). Além disso, estudo de prevalência do MAstV5 na China indicou que 12,02% (22/183) dos filhotes manifestando sinais clínicos de diarreia foram positivos para *astrovirus* pelo exame de

RT-PCR comparado a zero de 138 cães controles saudáveis (ZHU et al., 2011). Em um estudo conduzido na Itália, 24,5% de 110 amostras de fezes coletadas de cães sintomáticos e 9,3% de 75 de cães assintomáticos testados foram positivos para a presença do RNA de MAstV5. No mesmo estudo, teste sorológico indicou que 59% de 54 cães testados na Itália apresentaram anticorpos específicos para MAstV5, detectados quase exclusivamente em cães com idade acima de 3 meses de idade (MARTELLA et al., 2011). Similar prevalência foi encontrada na França, onde 20,9% (66/316) dos filhotes em 42% (14/33) dos canis testados foram positivos pelo teste de RT-PCR. No mesmo relato, os autores notaram que filhotes menores de sete semanas de vida foram especialmente susceptíveis à infecção (GRELLET et al., 2012).

Neste estudo, após um exame analítico de uma coleção de amostras fecais caninas, 26,39% (71/269) dos animais foram positivos para ambos os testes moleculares, ratificando outros estudos prévios de detecção que suportam a suposição da distribuição do MAstV5 em cães brasileiros. Ademais, entre as amostras positivas os cães menores de 360 dias (considerados como filhotes nesse estudo), englobam a maior parte, 59,15% (42/71), sugerindo uma predileção do vírus para a população jovem canina. Não obstante, existe um espaço nas informações de 32,39% (23/71) das amostras positivas em relação aos dados de idade não disponíveis para confirmar esse pressuposto. A maioria dos cães positivos para MAstV5 estavam também infectados por outros patógenos caninos como o CPV-2 42,25% (30/71) ou CDV 38,02% (21/71), enquanto infecções unicamente por MAstV5 foram detectadas em 29,58% (21/71) e correspondem aos cães assintomáticos. Esses achados não eram inesperados, já que as infecções mistas são frequentes, mas a evidência que o MAstV5 pode estar presente em cães assintomáticos em uma alta ocorrência contraria a afirmação que eles são os agentes primários de uma doença gastroentérica. Então, para elucidar a real importância patogênica do MAstV5, testes de infecção experimental *in vivo* são necessárias.

Além, o parcial sequenciamento genômico e a caracterização molecular de amostras positivas selecionadas revelou notável heterogeneidade entre as cepas de MAstV5. A partir da observação da baixa identidade do gene do capsídeo (< 85 %), pode-se indicar uma nova classificação entre a espécie MAstV5 em dois diferentes genótipos. Portanto, a análise filogenética mostrou que as quatro cepas de MAstV5 detectadas representam uma linhagem mais proximamente relacionada com as cepas chinesas, comparadas com as amostras italianas, reflexo da classificação acordada estabelecendo novos parâmetros pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (BOSCH et al., 2011).

Notavelmente, a sequência da ORF1b de MAstV5_Sara/2013/BRA, MAstV5_237/2013/BRA, MAstV5_GRAV/2013/BRA e MAstV5_5617/2012/BRA representaria teoricamente a região mais conservada entre as ORFs, porém apresentou menor similaridade entre as cepas de MAstV5. Por outro lado, se o heptâmero (A₆C), encontrado entre a porção 3' da ORF1a, estabeleceria um potencial marcador genético para os AstVs de diferentes hospedeiros e talvez também teria importante função durante a replicação viral, da mesma forma necessita de mais investigações.

A falta do domínio s2m nas amostras detectadas nesse estudo levanta a questão sobre o papel biológico desse domínio como sendo uma região alvo para a detecção dos AstVs (XIAO et al., 2013); no entanto, é possível que essas cepas formem uma outra estrutura secundária similar à s2m entre diferentes regiões, como proposto anteriormente (LUO et al., 2011). Em oposição, o domínio YGDD foi identificado nas quatro sequências analisadas, apresentando uma forte marcação genética para o gênero *Mamastrovirus* e sugere um importante papel biológico no ciclo viral como um elemento regulatório, servindo de promotor para a transcrição do RNA subgenômico (MÉNDEZ; ARIAS, 2013).

5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados obtidos através da análise de amostras positivas detectadas nesse trabalho através de técnicas moleculares, não só confirmam a circulação do *mamastrovirus5* no Brasil, como também evidenciam maior identidade com cepas chinesas e menor identidade com cepas oriundas da Itália, sugerindo a diferenciação em dois genótipos, conforme os resultados alcançados pela análise filogenética das quatro cepas sequenciadas. Ainda, indicou-se uma predileção por filhotes, categoria mais susceptível a infecção, sendo comum a co-infecção com outros patógenos virais. No entanto, hospedeiros assintomáticos do vírus também foram detectados positivos para a presença do RNA viral do MAstV5.

REFERÊNCIAS

BASS, D. M.; QIU, S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 74, n. 4, p. 1810–1814, 2000.

BASS, D. M.; UPADHYAYULA, U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 71, n. 11, p. 8666–8671, 1997.

BAXENDALE, W.; MEBATSION, T. The isolation and characterisation of astroviruses from chickens. **Avian Pathology : Journal of the W.V.P.A**, Abingdon, v. 33, n. 3, p. 364–370, 2004.

BELLIOT, G.; LAVERAN, H.; MONROE, S. S. Capsid protein composition of reference strains and wild isolates of human astroviruses. **Virus Research**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 49–57, 1997.

BEURET, C. Simultaneous detection of enteric viruses by multiplex real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 1–8, 2004.

BOSCH, A. et al. Family Astroviridae. In: KING, A. M. Q., et al. (Eds.). **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses**. 9th ed. New York: ICTV, 2011. p. 953–959.

BRITAIN, G.; LEE, T. W.; KURTZ, J. B. Serial propagation of astrovirus in tissue culture with the aid of trypsin. **Journal of General Virology**, London, v. 57, n. 2, p. 421–424, 1981.

CABALLERO, S. et al. Structural requirements of astrovirus virus-like particles assembled in insect cells. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 78, n. 23, p. 13285–13292, 2004.

CASTRO, T. X. et al. Molecular characterisation of calicivirus and astrovirus in puppies with enteritis. **The Veterinary Record**, London, v. 172, n. 21, p. 557, 25 maio 2013.

DE BENEDICTIS, P. et al. Astrovirus infections in humans and animals - Molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. **Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, v. 11, n. 7, p. 1529–1544, out. 2011.

DONELLI, G. et al. Mechanism of astrovirus entry into Graham 293 cells. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 38, n. 4, p. 271–277, 1992.

FINKBEINER, S. R.; KIRKWOOD, C. D.; WANG, D. Complete genome sequence of a highly divergent astrovirus isolated from a child with acute diarrhea. **Virology Journal**, London, v.5, p. 117, 2008.

- FU, Y. et al. Complete sequence of a duck astrovirus associated with fatal hepatitis in ducklings. **Journal of General Virology**, London, v. 90, n. 5, p. 1104–1108, 2009.
- GEIGENMU, U. et al. Studies on intracellular processing of the capsid protein of human astrovirus serotype 1 in infected cells. **Journal of General Virology**, London, v. 83, n. 7, p. 1691–1695, 2002.
- GRELLET, A. et al. Prevalence and risk factors of astrovirus infection in puppies from French breeding kennels. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 157, n. 1-2, p. 214–9, 25 maio 2012.
- GUIX, S. et al. C-terminal nsP1a protein of human astrovirus colocalizes with the endoplasmic reticulum and viral RNA. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 78, n. 24, p. 13627–13636, 2004.
- GUIX, S. et al. Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication. **Virology**, New York, v. 333, n. 1, p. 124–31, 1 mar. 2005.
- HAIR, P. S. et al. Human astrovirus coat protein binds C1q and MBL and inhibits the classical and lectin pathways of complement activation. **Molecular Immunology**, Elmsford, NY, v. 47, n. 4, p. 792–8, jan. 2010.
- HERRING, A. J.; GRAY, E. W.; SNODGRASS, D. R. Purification and characterization of ovine astrovirus. **Journal of General Virology**, London, v. 53, n. 1, p. 47–55, 1981.
- HERRMANN, J. E. et al. Diagnosis of astrovirus gastroenteritis by antigen detection with monoclonal antibodies. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 161, n. 2, p. 226–229, 1990.
- JANG, S. Y. et al. Detection of replicating negative-sense RNAs in CaCo-2 cells infected with human astrovirus. **Archives of Virology**, New York, v. 155, n. 9, p. 1383–9, set. 2010.
- JIANG, B. et al. RNA sequence of astrovirus: distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 90, n. 22, p. 10539–10543, 15 nov. 1993.
- JONASSEN, C. M. et al. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 82, n. 5, p. 1061–1067, 2001.
- JONASSEN, C. M. et al. Complete genomic sequences of astroviruses from sheep and turkey: Comparison with related viruses. **Virus Research**, Amsterdam, v. 91, n. 2, p. 195–201, 2003.
- KAPOOR, A. et al. Multiple novel astrovirus species in human stool. **Journal of General Virology**, London, v. 90, n. 12, p. 2965–2972, 2009.

LEWIS, T. L. et al. Analysis of astrovirus serotype 1 RNA, identification of the viral RNA-dependent RNA polymerase motif, and expression of a viral structural protein. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 68, n. 1, p. 77–83, 1994.

LEWIS, T. L.; MATSUI, S. M. An astrovirus frameshift signal induces ribosomal frameshifting in vitro. **Archives of Virology**, New York, v. 140, n. 6, p. 1127–1135, jun. 1995.

LEWIS, T. L.; MATSUI, S. M. Astrovirus ribosomal frameshifting in an infection-transfection transient expression system. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 70, n. 5, p. 2869–2875, 1996.

LEWIS, T. L.; MATSUI, S. M. Studies of the astrovirus signal that induces (-1) ribosomal frameshifting. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 412, p. 323–330, 1997.

LUO, Z. et al. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 316–323, 2011.

MADELEY, C. R.; COSGROVE, B. P. Letter: 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. **Lancet**, London, v. 2, n. 7932, p. 451–2, 6 set. 1975.

MARSHALL, J. A. et al. Viruses and virus-like particles in the faeces of dogs with and without diarrhoea. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 61, n. 2, p. 33–38, 1984.

MARTELLA, V. et al. Detection and characterization of canine astroviruses. **Journal of General Virology**, London, v. 92, n. Pt 8, p. 1880–7, ago. 2011.

MARTELLA, V. et al. Enteric disease in dogs naturally infected by a novel canine astrovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 50, n. 3, p. 1066–9, mar. 2012.

MARTELLA, V.; MOSCHIDOU, P.; BUONAVOGLIA, C. Astroviruses in dogs. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 41, n. 6, p. 1087–95, nov. 2011.

MÉNDEZ, E. et al. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 76, n. 16, p. 7996–8002, 2002.

MÉNDEZ, E. et al. Association of the astrovirus structural protein VP90 with membranes plays a role in virus morphogenesis. **Journal of Virology**, Washington, DC v. 81, n. 19, p. 10649–10658, 2007.

MÉNDEZ, E.; ARIAS, C. F. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields Virology**. 6th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. p. 609 – 628.

MÉNDEZ, E.; SALAS-OCAMPO, E.; ARIAS, C. F. Caspases mediate processing of the capsid precursor and cell release of human astroviruses. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 78, n. 16, p. 8601–8608, 2004.

MONROE, S. S. et al. Subgenomic RNA sequence of human astrovirus supports classification of Astroviridae as a new family of RNA viruses. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 67, n. 6, p. 3611–3614, 1993.

MOSER, L. A.; CARTER, M.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 81, n. 21, p. 11937–11945, 2007.

MOSER, L. A.; SCHULTZ-CHERRY, S. Pathogenesis of astrovirus infection. **Viral Immunology**, Larchmont, v. 18, p. 4–10, 2005.

QUAN, P. L. et al. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, Atlanta, v. 16, n. 6, p. 918–925, 2010.

RISCO, C. et al. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. **Journal of General Virology**, London, v. 76, n. 8, p. 2075–2080, 1995.

ROHAYEM, J. et al. A simple and rapid single-step multiplex RT-PCR to detect Norovirus, Astrovirus and Adenovirus in clinical stool samples. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 49–59, 2004.

SANCHEZ-FAUQUIER, A. et al. Characterization of a human astrovirus serotype 2 structural protein (VP26) that contains an epitope involved in virus neutralization. **Virology**, New York, v. 201, n. 2, p. 312–320, 1994.

SHIMIZU, M. et al. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 28, n. 2, p. 201–206, 1990.

SPERONI, S. et al. Structural and biochemical analysis of human pathogenic astrovirus serine protease at 2.0 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 387, n. 5, p. 1137–52, 17 abr. 2009.

TOFFAN, A. et al. Genetic characterization of a new astrovirus detected in dogs suffering from diarrhoea. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 139, n. 1-2, p. 147–52, 20 out. 2009.

VIELER, E.; HERBST, W. Electron microscopic demonstration of viruses in feces of dogs with diarrhea. **Tierärztliche Praxis**, Stuttgart, v. 23, n. 1, p. 66–69, 1995.

WALTER, J. E. et al. Molecular characterization of a novel recombinant strain of human astrovirus associated with gastroenteritis in children. **Archives of Virology**, New York, v. 146, n. 12, p. 2357–2367, 1 dez. 2001.

WANG, Q. H. et al. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 64, n. 3, p. 245–55, jul. 2001.

WILLCOCKS, M. M. et al. Cell culture adaptation of astrovirus involves a deletion. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 68, n. 9, p. 6057–6058, 1994.

WILLIAMS, F. P. Astrovirus-like, coronavirus-like, and parvovirus-like particles detected in the diarrheal stools of beagle pups. **Archives of virology**, New York, v. 66, n. 3, p. 215–226, 1980.

XIAO, C.-T. et al. Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. **Journal of General Virology**, London, v. 94, n. Pt 3, p. 570–82, mar. 2013.

YAN, H. et al. Detection of norovirus (GI, GII), Sapovirus and astrovirus in fecal samples using reverse transcription single-round multiplex PCR. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 37–44, 2003.

ZHU, A L. et al. Isolation and characterization of canine astrovirus in China. **Archives of virology**, New York, v. 156, n. 9, p. 1671–5, set. 2011.

ZHU, H. C. et al. Detection of diverse astroviruses from bats in China. **Journal of General Virology**, London, v. 90, n. 4, p. 883–887, 2009.