



Sağlıklı ve ishallerli köpeklerde Genogrup I Picobirnavirusların tespiti ve moleküler karakterizasyonu

İlke Karayel Hacıoğlu¹

¹Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı, 06110, Ankara, Türkiye

Geliş Tarihi / Received: 14.09.2021, Kabul Tarihi / Accepted: 11.10.2021

Özet: Picobirnaviruslar (PBV) ilk olarak 1988'de insan ve sıçanların dışkı örneklerinde tespit edilmelerinden bu yana ishallerli ya da asemptomatik diğer kara ve deniz memelilerinde, kuşlarda, omurgasızlarda ve ayrıca çevresel su örneklerinde rapor edilmiştir. Buna karşın, köpeklerde, PBV tespiti ve moleküler epidemiyolojisi hakkında sadece birkaç çalışma vardır. Bu çalışmada, klinik olarak ishal semptomu olan ve sağlıklı görünen 0-6 ay yaş arasındaki yavru köpeklere ait toplam 75 adet dışkı örneğinde PBV'lerin tespiti ve moleküler karakterizasyonu hedeflenmiştir. Bu amaçla örnekler, genogrup I (GGI) PBV'nin RdRp genini hedefleyen primerler kullanılarak RT-PCR uygulanmış ve test edilen örneklerin dört tanesi (%5.33) GGI PBV yönünden pozitif bulunmuştur. Bu örneklerden biri (CB1) ishallerli bir köpekten, diğer üç örnek (KB19, KB29, KB30) ise klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklerden elde edilmiştir. Bu çalışma ile ülkemizde ilk defa ishallerli ve klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklerde PBV varlığı ve moleküler karakterizasyonu ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Genogrup I, köpek, moleküler karakterizasyon, Picobirnavirus.

Detection and molecular characterization of Genogroup I Picobirnaviruses in dogs

Abstract: Picobirnaviruses (PBVs) have been reported in other terrestrial and marine mammals with or without diarrhea, birds, invertebrates, as well as environmental aquatic samples with diarrhea or asymptomatic since they were first detected in stool samples from humans and rats in 1988. However, in dogs, there are only a few reports of PBV detection and its molecular epidemiology. In this study, it was aimed to detect and molecular characterization of PBVs in a total of 75 stool samples obtained from puppies aged 0-6 months with diarrhea and clinically healthy. For this purpose, the RT-PCR was performed by using primers targeting the RdRp gene of genogroup I (GGI) PBV, and four of the tested samples (5.33%) were found positive for GGI PBV. One of these samples (CB1) was obtained from a dog with diarrhea, and the other three samples (KB19, KB29, KB30) were obtained from clinically healthy dogs. In this study, the presence and molecular characterization of PBV in dogs with diarrhea and clinically healthy appearance were revealed for the first time in our country.

Keywords: Genogroup I, dog, molecular characterization, Picobirnavirus.

Giriş

Picobirnaviruslar (PBV), *Picobirnaviridae* ailesinde yer alan, 35 nm çapında, 60 simetrik dimerden oluşan basit bir ikosaedral kapside sahip, küçük, zarfsız viruslardır (Delmas ve ark. 2019; Ghosh and Malik, 2021). Genomları, iki segmentli çift sarmallı RNA'dan (dsRNA) oluşmaktadır. Büyük genom segmenti (segment 1) 2.3 ila 2.6 kb boyutundadır ve kapsid proteini ile birlikte fonksiyonu henüz bilinmeyen bir polipeptidi kodlamaktadır (Delmas ve ark. 2019). Küçük genom segmenti (segment 2) (1.5-1.9 kb) viral RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) kodlar. RdRp gen bölgesinin dizilerine dayanarak, PBV'ler genogrup I (GGI) (prototip suşu, 1-CHN-97), genogrup II (GGII) (prototip suşu, 4-GA-91) ve genogrup III (GGIII) olmak üzere üç genogruba ayrılır (ICTV, 2020).

PBV'ler ilk olarak 1988'de insan ve sıçanların dışkı örneklerinde tespit edilmelerinden bu yana (Pereira ve ark. 1988, 1989), diğer kara ve deniz memelilerinde, kuşlarda, omurgasızlarda ve çevresel su örneklerinde rapor edilmiştir (Symonds ve ark. 2009; Ganesh ve ark. 2014; Kashnikov ve ark. 2020). PBV'ler çoğunlukla ishallerli insan ve hayvanlarda tespit edilmiş olsa da, klinik olarak sağlıklı insan ve hayvanlardaki varlığı da rapor edilmiştir (Fregolente ve ark. 2009; Malik ve ark. 2014; Kleymann ve ark. 2020). Bu nedenle, PBV'ler genel olarak fırsatçı enteropatojen olarak tanımlanmaktadır. Aynı zamanda memelilerin solunum yollarında PBV'lerin tespiti ile ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Woo ve ark. 2019; Huaman ve ark. 2021).

Bugüne kadar, PBV'lerin gerçek konakları ve coğrafi dağılımları tam olarak aydınlatılmamıştır

(Joyceyn ve ark, 2020; Ghosh ve Malik, 2021). PBV'ler çeşitli türlerde tespit edilmesine karşın, köpeklerde PBV tespiti ve moleküler epidemiyolojisi hakkında sadece birkaç çalışma bulunmaktadır (Costa ve ark. 2004; Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017). Bu çalışmada, klinik olarak ishal semptomları olan ve sağlıklı görünen 0-6 ay yaş arasındaki yavru köpeklerden PBV'lerin tespiti ve moleküler karakterizasyonu amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, daha önce laboratuvara gönderilen, klinik olarak ishal semptomları olan (n=45) ve sağlıklı görünen (n=30) 0-6 ay yaş arasındaki yavru köpeklere ait toplam 75 adet dışkı örneği kullanıldı. Örnekler, ishallerli köpeklerden klinik semptomların başlamasından sonraki yedi gün içinde alındı.

Viral RNA ekstraksiyonu TRIzol® LS Reagent (Thermo Fisher Scientific, 10296-028) kullanılarak gerçekleştirildi. Viral RNA'nın denatürasyonunu (95°C'de 5 dk sonrasında 4°C'de 1 dk) takiben, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Köpek dışkı örneklerinde GGI PBV'yi tespit etmek amacıyla PCR testi uygulandı. Bu amaçla RdRp geninin 201 bp'lik bir parçasını hedefleyen PicoB25 ve PicoB43 primerleri (Rosen ve ark. 2000) kullanıldı. PCR protokolü, 95°C'de 2 dk başlangıç denatürasyonunu takiben toplam 40 siklus olmak üzere, denatürasyon aşaması 95 °C'de 1 dk, annealing aşaması 50°C'de 1 dk, uzama aşaması 72°C'de 1 dk ve son uzama aşaması 72°C'de 7 dk olan ısı döngüsünden oluştu. PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri SafeView™ Classic (ABM, Canada) ile hazırlanan %1'lik agaroz jel elektroforezi sonrasında UV ışığı altında gözlemlendi. Elde edilen PCR ürünleri, amplifikasyon için kullanılanlar ile aynı primerler kullanılarak çift yönde sekanslandı. Farklı PBV RdRp genini temsil eden referans diziler, BLAST motoru aracılığıyla GenBank veri tabanından alındı. Elde edilen dizinler Aliview (Larsson, 2014) ve MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation) yazılımı (Edgar, 2004) kullanılarak GenBankasından elde edilen referans virüsler ve referans olmayan diğer ülkelerden bildirilen yerel virüslerin genom dizileri ile hizalandı.

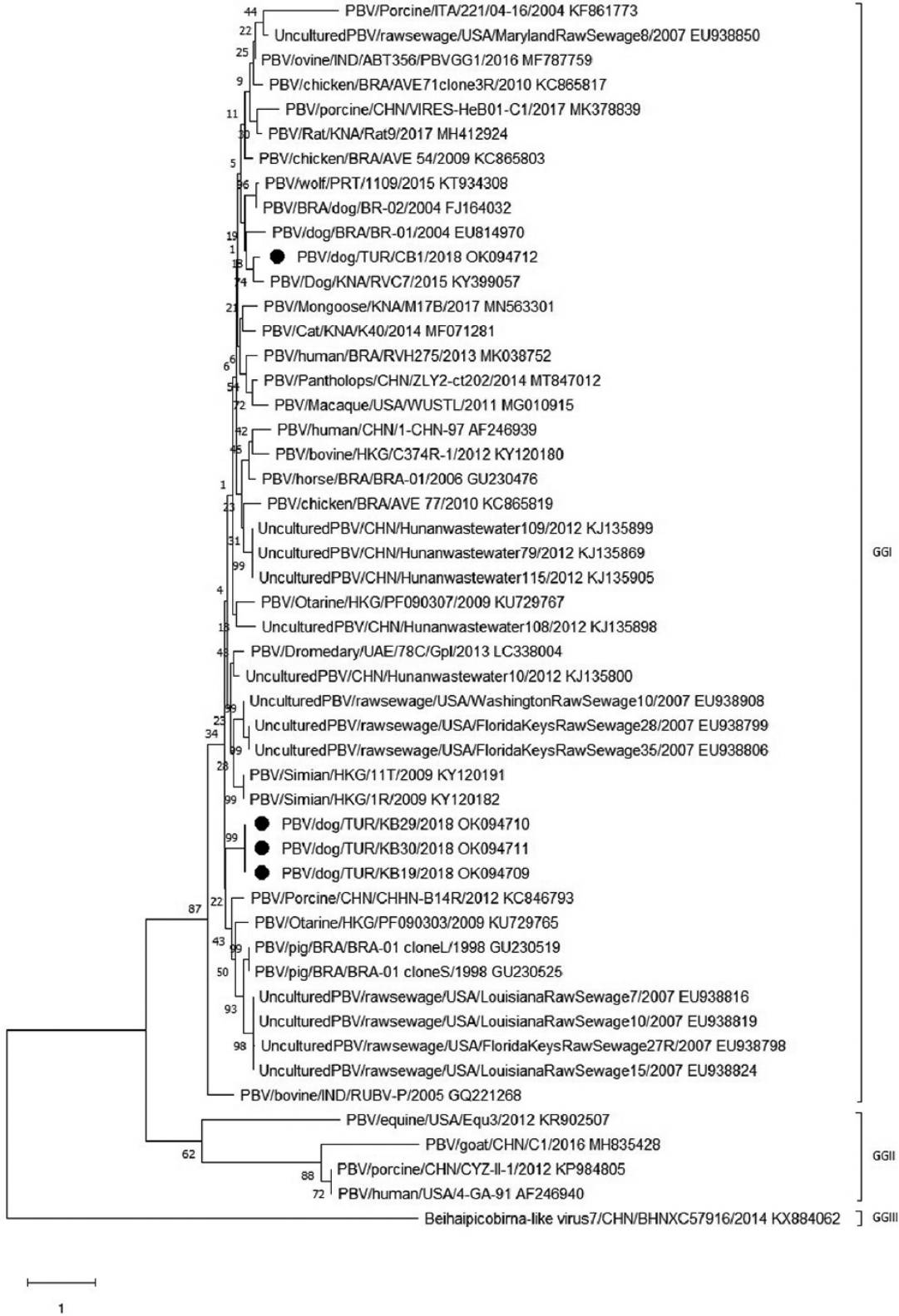
Diğer ülkelerde tespit edilen virüsler ile bu çalışmada elde edilen virüsler arasındaki genetik yakınlık düzeyinin ortaya konulması amacıyla nükleik asit dizinleri üzerinden gerçekleştirilen filogenetik analiz için MEGAX (Kumar ve ark. 2018) programı kullanıldı. Filogenetik ağaç, Maximum-likelihood metoduna göre Tamura3+G modeli kullanılarak inşa edildi ve bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Nükleotid (nt) ve amino asit (aa) benzerlikleri, SIAS çevrimiçi aracı (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>) kullanılarak hesaplandı.

Bulgular

Test edilen toplam 75 dışkı örneğinin dört tanesi (%5.33) PBV yönünden pozitif bulundu. Bu örneklerden biri (CB1) ishallerli bir köpeğe, diğer üç örnek (KB19, KB29, KB30) ise klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklere aitti. İshallerli ve sağlıklı görünümlü köpeklerde GGI PBV pozitiflik oranı sırasıyla %2.2 ve %10 bulundu.

Filogenetik ağaçtaki yerleşimleri (Şekil 1) incelendiğinde CB1'in köpek PBV suşları (PBV/dog/BR-01/BRA/2004, PBV/dog/BR-02/BRA/2004 ve PBV/Dog/KNA/RVC7/2015) ve kurt PBV suşu (PBV/wolf/PRT/1109/2015) ile aynı dalda yer aldığı gözlemlendi. Buna karşın KB19, KB29 ve KB30 virüslerinin ise birlikte tek bir dalda yer aldığı ve domuz PBV suşlarının yanı sıra çoğunlukla kanalizasyon sularında tespit edilen PBV suşlarıyla birlikte kümelenildiği tespit edildi.

RdRp gen bölgesinin kısmi dizininin moleküler analizi, dört köpekten saptanan virüslerin birbiriyle %66.66-100 nt ve %71.21-100 aa benzerliği gösterdiğini ortaya koydu. Bu analiz iki köpekten (K29 ve K30) saptanan virüslerin nt dizinlerinin birbirleriyle aynı olduğunu, bir diğerinin (K19) ise bu ikisinden yalnızca bir nt farklı bir dizine sahip olduğunu gösterdi. Dolayısıyla nt ve aa benzerlikleri, bu üç virus ile CB1 arasında en düşük düzeydeydi (sırasıyla %66.66 ve %71.21). Bu çalışmada saptanan virüslerin GGI'in referans suşu 1-CHN-97 ile olan nt ve aa benzerlik oranları sırasıyla %66.1-67.6 ve %60.6-65.1; GGI'de yer alan diğer suşlar ile olan nt ve aa benzerlik oranları ise sırasıyla %55.2-81 ve %45.5-84.8 olarak tespit edildi.



Şekil 1. RdRp gen bölgesinin kısmi uzunluktaki nükleotid dizilerine (201 bp) dayanılarak yapılan filogenetik ağaç. Filogenetik ağaç, Maximum-likelihood metoduna göre Tamura3+G modeli kullanılarak inşa edildi ve bootstrap analizi (1000 replicates) yapıldı. Bu çalışmada tespit edilen PBV'ler siyah noktalarla belirtildi.

Tartışma ve Sonuç

PBV birçok evcil ve yaban hayvan türlerinden alınan dışkı örneklerinde tespit edilmiştir (Fregolente ve ark. 2009; Chen ve ark. 2014; Malik ve ark. 2018; Joycelyn ve ark. 2020; Teng ve ark. 2021). Bununla birlikte, bugüne kadar, PBV'nin köpeklerdeki tespitlerine ilişkin sınırlı sayıda çalışma (Costa ve ark. 2004; Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017) bildirilmiş olup bunlardan yalnızca ikisi (Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017) moleküler karakterizasyonlarına ilişkindir. Bu çalışmada ülkemizde ilk defa ishallerde ve klinik olarak sağlıklı yavru köpeklerde PBV'nin tespiti ve moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

PBV'ler sıklıkla ishallerde insan ve hayvanlarda tek başlarına ya da diğer patojenlerle birlikte saptanmalarına rağmen (Ganesh ve ark. 2014), asemptomatik vakalarda da sıklıkla tespit edilmektedir (Fregolente ve ark. 2009; Malik ve ark. 2014; Kleymann ve ark. 2020). Bu nedenle PBV'nin gastroenteritis enfeksiyonlarındaki rolleri tam olarak açıklanamamakta ve genel olarak fırsatçı enteropatojen olarak tanımlanmaktadır (Kashnikov ve ark. 2020; Ghosh ve Malik, 2021). Köpeklere ilişkin daha önce yapılan çalışmalarda bu ajanların varlığının hem ishallerde hem de asemptomatik örneklerde tespit edildiği bildirilmiştir (Costa ve ark. 2004; Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017). Brezilya'da yapılan iki çalışmanın birinde ishallerde köpeklerde %1.8 oranında PBV saptanırken (Costa ve ark. 2004), diğer çalışma asemptomatik köpeklerde gerçekleştirilmiş ve %0.86 oranında pozitiflik bulunmuştur (Fregolente ve ark. 2009). St. Kitts'de yapılan diğer çalışmada ise ishallerde köpeklerde %2.3 oranında pozitiflik bulunmuştur (Navarro ve ark. 2017). Bu çalışmada ishallerde ve klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklerde saptanan PBV pozitiflik oranları sırasıyla %2.2 ve %10; örneklenen popülasyon için ise %5.3 olarak bulunmuştur. Sağlıklı görünümlü köpeklerdeki pozitiflik oranının (%10) hem köpeklerle ilgili bildirimlere (Costa ve ark. 2004; Fregolente ve ark. 2009; Navarro ve ark. 2017) hem de bu çalışmada ishallerde köpeklerde saptanan orana göre oldukça yüksek olması, filogenetik ağaçtaki yerleşimleri de dikkate alındığında, konakçı-çevre etkileşiminin olası etkisini akla getirmektedir.

Elde edilen PBV'lerin moleküler karakterizasyonu, tümünün GGI'de yer aldığını göstermektedir. Tek bir nt farkı haricinde özdeş bulunan üç PBV'nin (KB19, KB29 ve KB30), aynı yerde yaşayan köpeklerden elde edilmiş olması, enfeksiyonun sirküle olan tek bir virustan kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu üç virus ile CB1 arasındaki nt ve aa benzerlikleri sırasıyla %66.66 ve %71.21 olarak hesaplanmıştır.

Filogenetik analize bakıldığında ise ishallerde köpekten elde edilen CB1 ile klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklerden elde edilen virusların (KB19, KB29 ve KB30) ayrı dallarda kümelendikleri gözlenmiştir. CB1 virusu, PBV/Dog/KNA/RVC7/2015 suşu ile en yakın olmak üzere, diğer köpek PBV suşları (dog/BR-01/BRA/2004, dog/BR-02/BRA/2004) ve kurt PBV suşu (PBV/wolf/PRT/1109/2015) ile birlikte aynı dalda yer almıştır (Şekil 1). Buna karşın KB19, KB29 ve KB30 virusları domuz PBV suşlarının yanı sıra çoğunlukla kanalizasyon sularında tespit edilen PBV suşlarıyla birlikte kümelenmiştir. Filogenetik ağaç ve benzerlik oranları, GGI PBV suşları arasında gözlenen yüksek düzeyde genetik çeşitliliği doğrular niteliktedir (Wang ve ark. 2012; Woo ve ark. 2016; Navarro ve ark. 2017; Navarro ve ark. 2018). Filogenetik olarak PBV için türe özgü kümelenme modelleri şimdiye kadar gözlemlenmemiştir (Woo ve ark. 2016; Delmas ve ark. 2019; Ghosh ve Malik, 2021). Bununla birlikte, sekans ve filogenetik analize dayalı olarak, bu çalışmaların birçoğunda insan dahil türler arası geçiş olabileceği belirtilmesine rağmen bu durum kesinlik kazanmamıştır (Ganesh ve ark. 2011, 2014; Wang ve ark. 2012; Joycelyn ve ark. 2020). Önceki çalışmalar, insan, domuz ve simian PBV'leri arasındaki yakınlığı bildirmiştir (Bányai ve ark. 2008; Wang ve ark. 2012; Chen ve ark. 2014; Joycelyn ve ark. 2020). Ayrıca Amerika'da atık su numuneleri üzerinde yapılan bir çalışma, GGI PBV RNA'sının kanalizasyon suyu numunelerinin %100'ünde ve arıtılmış atık su numunelerinin de %33'ünde tespit edildiğini göstermiştir (Symonds ve ark. 2009). Wang ve ark. (2012), aynı ortamda farklı konakçı türlerde yakın ilişkili PBV ile oluşan enfeksiyonların nasıl edinildiğini su kaynaklı bir PBV enfeksiyonu ile açıklayabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da tespit edilen virusların moleküler analizinde en yakın olarak kanalizasyon sularında tespit edilen PBV'lerin yanı sıra farklı türlerde saptanan PBV'ler ile de yakın olması türler arası geçişe dair önermeleri akla getirmektedir.

Bu çalışmada ülkemizde ilk defa ishallerde ve klinik olarak sağlıklı görünümlü köpeklerde PBV varlığı ortaya konulmuştur. Köpeklerde PBV hakkında veri eksikliği, türler arası geçiş ve PBV'lerin zoonotik potansiyeli hakkında son bilgiler göz önüne alındığında, PBV'lerin tespiti ve moleküler karakterizasyonu hakkında daha fazla çalışma yapılması önemlidir.

Çıkar Çatışması Bildirimi: Yazarların herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Bildirim: Çalışma etik ilke ve kuralları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir ve deney hayvanları etik kurulu iznine gerektirir.

Kaynaklar

- Bányai K, Martella V, Bogdán Á, Forgách P, Jakab F, Meleg E, Bíró H, Melegh B, Szucs G. (2008) Genogroup I picobirnaviruses in pigs: Evidence for genetic diversity and relatedness to human strains. *J. Gen. Virol.* 89, 534–539. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83134-0>
- Chen M, Sun H, Lan D, Hua X, Cui L, Yuan C, Yang Z. (2014) Molecular detection of genogroup I and II picobirnaviruses in pigs in China. *Virus Genes* 48, 553–556. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1058-8>
- Costa AP, Cubel Garcia RCN, Labarthe NV, Leite JPG (2004) Detection of double-stranded RNA viruses in fecal samples of dogs with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 56, 554–557. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352004000400020>
- Delmas B, Attoui H, Ghosh S, Malik YS, Mundt E, Vakharia VN. (2019) Ictv virus taxonomy profile: Picobirnaviridae. *J. Gen. Virol.* 100, 133–134. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001186>
- Edgar RC. (2004) MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fregolente MCD, de Castro-Dias E, Martins SS, Spilki FR, Allegretti SM, Gatti MSV. (2009) Molecular characterization of picobirnaviruses from new hosts. *Virus Res.* 143, 134–136. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.03.006>
- Ganesh B, Masachessi G, Mladenova Z. (2014) Animal Picobirnavirus. *VirusDisease* 25, 223–238. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0207-y>
- Ganesh B, Nataraju S, Pativada M, Kumar R, Banyai K, Masachessi G, Mladenova Z, Nagashima S, Ghosh S, Kobayashi N. (2011) Genogroup I picobirnavirus in diarrhoeic foals: Can the horse serve as a natural reservoir for human infection? *Vet. Res.* 42, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-2>
- Ghosh S, Malik YS. (2021) The True Host/s of Picobirnaviruses. *Front. Vet. Sci.* 7, 6–8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.615293>
- Huaman JL, Pacioni C, Sarker S, Doyle M, Forsyth DM, Pople A, Hampton JO, Carvalho TG, Helbig KJ. (2021) Molecular Epidemiology and Characterization of Picobirnavirus in Wild Deer and Cattle from Australia: Evidence of Genogroup I and II in the Upper Respiratory Tract. *Viruses* 13, 1492. <https://doi.org/10.3390/v13081492>
- ICTV. (2020) Picobirnaviridae Erişim adresi: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsrna-viruses/w/picobirnaviridae, Erişim tarihi: 01.09.2021.
- Joycelyn SJ, Ng A, Kleymann A, Malik YS, Kobayashi N, Ghosh S. (2020) High detection rates and genetic diversity of picobirnaviruses (PBVs) in pigs on St. Kitts Island: Identification of a porcine PBV strain closely related to simian and human PBVs. *Infect. Genet. Evol.* 84, 104383. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104383>
- Kashnikov AY, Epifanova NV, Novikova NA. (2020) Picobirnaviruses: Prevalence, genetic diversity, detection methods. *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii* 24, 661–672. <https://doi.org/10.18699/VJ20.660>
- Kleymann A, Becker AAMJ, Malik YS, Kobayashi N, Ghosh S. (2020) Detection and molecular characterization of picobirnaviruses (PBVs) in the mongoose: Identification of a novel PBV using an alternative genetic code. *Viruses* 12, 1–13. <https://doi.org/10.3390/v12010099>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Larsson A. (2014) AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Malik YS, Kumar N, Sharma K, Dhama K, Shabbir MZ, Ganesh B, Kobayashi N, Banyai K. (2014) Epidemiology, Phylogeny, and Evolution of Emerging Enteric Picobirnaviruses of Animal Origin and Their Relationship to Human Strains. *Biomed Res. Int.* 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/780752>
- Malik YS, Sircar S, Saurabh S, Kattoor JJ, Singh R, Ganesh B, Ghosh S, Dhama K, Singh RK. (2018) Epidemiologic Status of Picobirnavirus in India, A Less Explored Viral Disease. *Open Virol. J.* 12, 99–109. <https://doi.org/10.2174/1874357901812010099>
- Navarro J de O, Candido M, de Almeida-Queiroz SR, Buzinaro M da G, Livonesi MC, Fernandes AM, de Sousa RLM. (2018) Genetic diversity of bovine Picobirnavirus, Brazil. *Virus Genes* 54, 724–728. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-1586-8>
- Navarro R, Yibin C, Nair R, Peda A, Aung MS, Ketzis J, Malik YS, Kobayashi N, Ghosh S. (2017) Molecular characterization of complete genomic segment-2 of picobirnavirus strains detected in a cat and a dog. *Infect. Genet. Evol.* 54, 200–204. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.07.006>
- Pereira HG, Araújo HP de, Fialho AM, Castro L de, Monteiro SP. (1989) A virus with bi-segmented double-stranded RNA genome in guinea pig intestines. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 137–140. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000100025>
- Pereira HG, Fialho AM, Flewett TH, Teixeira JMS, Andrade ZP. (1988) Novel Viruses in Human Faeces. *Lancet* 332, 103–104. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90032-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90032-3)
- Rosen BI, Fang ZY, Glass RI, Monroe SS. (2000) Cloning of human picobirnavirus genomic segments and development of an RT-PCR detection assay. *Virology* 277, 316–329. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0594>
- Symonds EM, Griffin DW, Breitbart M. (2009) Eukaryotic viruses in wastewater samples from the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1402–1409. <https://doi.org/10.1128/AEM.01899-08>
- Teng JLL, Wernery U, Wong PC, Chan E, Lee HH, Joseph S, Bai R, Tang Y, Wong EYM, Lau SKP, Woo PCY (2021) High Prevalence of Genogroup I and Genogroup II Picobirnaviruses in Dromedary Camels. *Viruses* 13, 430. <https://doi.org/10.3390/v13030430>
- Wang Y, Banyai K, Tu X, Jiang B. (2012) Simian genogroup I picobirnaviruses: Prevalence, genetic diversity, and zoonotic potential. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2779–2782. <https://doi.org/10.1128/JCM.00634-12>
- Woo PCY, Teng JLL, Bai R, Tang Y, Wong AYP, Li KSM, Lam CSF, Fan RYY, Lau SKP, Yuen K. (2019) Novel Picobirnaviruses in Respiratory and Alimentary Tracts of Cattle and Monkeys with Large Intra- and Inter-Host Diversity. *Viruses* 11, 574. <https://doi.org/10.3390/v11060574>
- Woo PCY, Teng JLL, Bai R, Wong AYP, Martelli P, Hui SW, Tsang AKL, Lau CCY, Ahmed SS, Yip CCY, Choi GKY, Li KSM, Lam CSF, Lau SKP, Yuen KY. (2016) High diversity of genogroup I picobirnaviruses in mammals. *Front. Microbiol.* 7, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01886>