



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANILO RATTI DA SILVA

**ESTUDO LONGITUDINAL DA EXCREÇÃO FECAL DE
TESCHOVIRUS A, *SAPELOVIRUS A* E *ENTEROVIRUS G* EM
LEITÕES PROVENIENTES DE UMA GRANJA LOCALIZADA
EM GUARAPUAVA, PARANÁ, BRASIL**

Londrina
2015

DANILO RATTI DA SILVA

**ESTUDO LONGITUDINAL DA EXCREÇÃO FECAL DE
TESCHOVIRUS A, *SAPELOVIRUS A* E *ENTEROVIRUS G* EM
LEITÕES PROVENIENTES DE UMA GRANJA LOCALIZADA
EM GUARAPUAVA, PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – área de concentração Sanidade Animal – da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586e Silva, Danilo Ratti da.

Estudo longitudinal da excreção fecal de *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G* em leitões provenientes de uma granja localizada em Guarapuava, Paraná, Brasil / Danilo Ratti da Silva. – Londrina, 2015.
65 f.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Leitão (Suíno) – Doenças – Paraná – Teses. 2. Leitão (Suíno) – Viroses – Teses.
3. Virologia veterinária – Teses. 4. Reação em cadeia de polimerase – Teses.
I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.4

DANILO RATTI DA SILVA

**ESTUDO LONGITUDINAL DA EXCREÇÃO FECAL DE
TESCHOVIRUS A, *SAPELOVIRUS A* E *ENTEROVIRUS G* EM LEITÕES
PROVENIENTES DE UMA GRANJA LOCALIZADA EM
GUARAPUAVA, PARANÁ, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – área de concentração Sanidade Animal – da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 29 de maio de 2015.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob a orientação do Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa, abaixo relacionados:

- 1. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico / MCT**
- 2. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC**
- 3. FAP/PR: Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná / SETI**
- 4. FINEP: Financiadora de Estudos e Projetos / MCT**

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

A Universidade Estadual de Londrina, seu corpo docente e direção.

Aos meus orientadores Amauri Alcindo Alfieri e Alice Fernandes Alfieri, pelo suporte no pouco tempo que lhes coube, suas correções e incentivos.

Aos professores que fizeram parte da banca de defesa Dr. Selwyn Arlington Headley e Dr. Marco Antonio Bacellar Barreiros

A Elis Lorenzetti e Raquel de Arruda Leme, pela ajuda na elaboração do projeto, e no esclarecimento das dúvidas que surgiram (que foram muitas) durante o mestrado.

A família Lab.Viral. e a todos que direta ou indiretamente fizeram parte desta formação, o meu muito obrigado.

A minha mãe e família pelo amor e apoio incondicional.

A Lorena Zacharias que esteve sempre ao meu lado compreendendo meus momentos de ausência, dando-me apoio e carinho.

Meus sinceros agradecimentos!

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

Chico Xavier

SILVA, Danilo Ratti. **Estudo longitudinal da excreção fecal de *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G* em leitões provenientes de uma granja localizada em Guarapuava, Paraná, Brasil.** 2015. 65 fls. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal; Área de Concentração: Sanidade Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

RESUMO

A família *Picornaviridae* é, atualmente, dividida em 29 gêneros que agrupam espécies virais de importância para humanos e animais. Entre os picornavírus de importância para suínos, encontram-se o *Teschovirus A* (TV-A), *Sapelovirus A* (SV-A) e *Enterovirus G* (EV-G), também conhecidos como picornavírus entéricos suínos. As principais patologias associadas a estes vírus são doenças neurológicas, reprodutivas, respiratórias e/ou entéricas, na dependência da presença de diferentes sorotipos de cada uma das espécies virais durante a infecção. O objetivo deste estudo foi realizar a avaliação longitudinal da dinâmica da excreção fecal do TV-A, SV-A e EV-G em animais lactentes e desmamados. As amostras fecais incluídas neste estudo foram coletadas de suínos provenientes de uma granja localizada em Guarapuava, estado do Paraná, em 2012, armazenadas a -80°C . Amostras fecais de 17 animais cuja consistência variava de sólida a líquida foram aleatoriamente selecionadas, exceto pelo critério idade, sendo incluídas amostras de animais que foram amostrados inicialmente na fase de maternidade e reamostrados durante a fase de creche, totalizando 34 amostras fecais. A presença do TV-A, SV-A e EV-G foi investigada utilizando a reação em cadeia da polimerase seguida da transcrição reversa (RT-PCR) e a *nested*-PCR. O alvo foi a região 5' não traduzida do genoma de cada um dos vírus pesquisados. Os resultados revelaram que não havia excreção de nenhum dos picornavírus entéricos suínos enquanto os animais estavam na idade de maternidade (duas a três semanas de idade) entretanto, entre as 17 amostras fecais coletadas dos mesmos animais durante o período de creche (quatro a seis semanas de idade), 12 foram positivas para o TV-A, nove para o SV-A e 14 para o EV-G. A excreção singular (EV-G, $n=2$) e mista (TV-A e EV-G, $n=3$; TV-A, SV-A e EV-G, $n=9$) foi detectada. A análise de sequenciamento confirmou a especificidade dos *amplicons* obtidos para cada um dos vírus, revelando identidade as sequências de nucleotídeos do banco de dados variando entre 96,1 e 99,3% para o TV-A, 96,1 e 99% para o SV-A e 88,4 e 99,6% para o EV-G. Este é o primeiro estudo longitudinal realizado no Brasil para a avaliação da excreção fecal dos picornavírus entéricos suínos. Os resultados mostraram que a infecção pelo TV-A, SV-A e EV-G em animais de até três semanas de idade não foi um evento comum e que as infecções pelos picornavírus entéricos suínos apareceram de acordo com a idade dos animais. Adicionalmente, os resultados sugerem que a transmissão horizontal pelo contato direto entre os animais exerce importante papel na epidemiologia das infecções pelos picornavírus entéricos suínos, mantendo a circulação viral dentro dos rebanhos.

Palavras-chave: *Teschovirus A*. *Sapelovirus A*. *Enterovirus G*. *Nested*-PCR. Estudo longitudinal.

SILVA, Danilo Ratti. **Longitudinal survey of *Teschovirus A*, *Sapelovirus A*, and *Enterovirus G* fecal excretion of pigs originating from a farm located in Guarapuava, Paraná, Brazil.** 2015. 65 f. Dissertation (Master's Degree in Animal Health Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

ABSTRACT

The *Picornaviridae* family is currently divided into 29 genera that group species of importance to humans and animals. Among picornaviruses of importance for pigs are the *teschovirus A* (TV-A), *sapelovirus A* (SV-A), and *enterovirus G* (EV-G), also known as porcine enteric picornaviruses. The major pathologies associated with these viruses are neurological, reproductive, respiratory and / or enteric diseases, depending on the presence of different serotypes of each species during viral infection. The aim of this study was to evaluate the longitudinal dynamics of fecal excretion of TV-A, SV-A, and EV-G in suckling and weaned pigs. Fecal samples included in this study were collected from pigs of a single farm located in Guarapuava, Paraná, in 2012 and were stored at -80°C. Fecal samples, which consistency ranged from solid to liquid, of 17 animals were randomly selected, except for the age of the animals, being included fecal samples from animals that were sampled during the suckling age (two to three weeks old) and resampled during the nursery (four to six weeks of age). A total of 34 fecal samples were evaluated. The presence of the TV-A, SV-A, and EV-G were investigated using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested-PCR assays, which targeted the 5' non-translated region of the genome of each of the studied viruses. The results showed that there was no fecal excretion of porcine enteric picornaviruses while the animals were at suckling age. However, among the 17 fecal samples collected from the same animals during the nursery period, 12 were positive for the TV-A, nine for the SV-A, and 14 for the EV-G. The single (EV-G, $n=2$) and mixed (TV-A and EV-G, $n=3$; TV-A, SV-A, and EV-G, $n=9$) fecal excretion were detected. The nucleotide sequence analysis confirmed the specificity of the amplicons obtained for each virus, revealing nucleotide sequence similarities ranging from 96.1 and 99.3% for TV-A, 96.1 and 99% for SV-A, and 88.4 and 99.6% for EV-G. This is the first longitudinal study to evaluate the fecal excretion of porcine enteric picornaviruses. The results showed that at suckling stage infection with TV-A, SV-A, and EV-G is not a common event, and the infections caused by porcine enteric picornaviruses increase with the age of the animals. Additionally, the results suggest that the horizontal transmission by contact between animals plays an important role in the epidemiology of porcine enteric picornavirus infections for the maintenance of virus circulation within a pig herd.

Key words: *Teschovirus A*. *Sapelovirus A*. *Enterovirus G*. Nested-PCR. Longitudinal study .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LONGITUDINAL SURVEY OF *TESCHOVIRUS A*, *SAPELOVIRUS A*, AND *ENTEROVIRUS G* FECAL EXCRETION FROM NATURALLY INFECTED SUCKLING AND WEANED PIGS

Figure 1 – Genetic relationship of *teschovirus A* (TV-A), *sapelovirus A* (SV-A), and *enterovirus G* (EV-G) of Brazilian strains and other published sequences which represent picornavirus genera..... 32

LISTA DE TABELAS

LONGITUDINAL SURVEY OF TESCHOVIRUS A, SAPELOVIRUS A, AND ENTEROVIRUS G FECAL EXCRETION FROM NATURALLY INFECTED SUCKLING AND WEANED PIGS

Table 1 – Single and mixed teschovirus A (TV-A), sapelovirus A (SV-A), and enterovirus G (EV-G) fecal excretion detected by n-PCR assays in a longitudinal survey from pigs at suckling and nursery ages..... 30

APÊNDICE A

Table 1– Porcine enteric picornavirus detection by RT-PCR assay in paired fecal samples from suckling and nursery pigs 45

APÊNDICE B

Table 2 – Percentage of similarity between 5'-non-translated nucleotide sequences in this study, previously reported Brazilian strains, and other porcine enteric picornavirus sequences available in GenBank..... 46

APÊNDICE C

Table 3. TV-A nucleotide sequences described in this study 47

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	12
1.1	REFERÊNCIAS	18
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	LONGITUDINAL SURVEY OF TESCHOVIRUS A, SAPELOVIRUS A, AND ENTEROVIRUS G FECAL EXCRETION FROM NATURALLY INFECTED SUCKLING AND WEANED PIGS	
3.1	LONGITUDINAL SURVEY OF TESCHOVIRUS A, SAPELOVIRUS A, AND ENTEROVIRUS G FECAL EXCRETION FROM NATURALLY INFECTED SUCKLING AND WEANED PIGS.....	24
	Abstract.....	25
	Introduction	26
	Materials and Methods	27
	Fecal samples and pig herd.....	27
	RNA extraction.....	28
	Teschovirus A, sapelovirus A and enterovirus G detection	28
	Sequencing and phylogenetic analysis	28
	Results	29
	Discussion.....	33
	Conclusion.....	36
	Acknowledgements	36
	Animal Rights.....	36
	Conflict of Interest.....	36
	References	37
4	CONCLUSÕES	43
	APÊNDICES	44
	APÊNDICE A – Porcine enteric picornavirus detection by RT-PCR assay in paired fecal samples from suckling and nursery pigs.....	45

APÊNDICE B – Percentage of similarity between 5'-non-translated nucleotide sequences in this study, previously reported Brazilian strains, and other porcine enteric picornavirus sequences available in GenBank	46
APÊNDICE C – TV-A nucleotide sequences described in this study	47
ANEXOS	48
ANEXO A – Lista de Reagentes	49
ANEXO B – Soluções e Tampões.....	52
ANEXO C – Protocolos de Técnicas	58
ANEXO D – Lista de Softwares.....	65

1 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

A família *Picornaviridae* é dividida em 29 gêneros e inclui vírus de importância para humanos e animais (ICTV, 2014). Os vírus desta família são pequenos e possuem como genoma RNA fita simples de polaridade positiva, cujo tamanho varia entre 7,2 a 8,4 kilobases. Os vírions são esféricos, com diâmetro de aproximadamente 30 nm e possuem um capsídeo com simetria icosaédrica ao redor do RNA genômico, e são desprovidos de envelope (RACANIELLO, 2007).

O genoma dos picornavírus possui uma região 5' não traduzida, relativamente longa, que contém sequências que atuam no processo de replicação viral. O restante do genoma possui uma poliproteína dividida em três regiões maiores, denominadas P1, P2 e P3. A região P1 codifica as proteínas estruturais do capsídeo, enquanto as regiões P2 e P3 codificam proteínas envolvidas no processamento das demais proteínas e na replicação viral. A região 3' não traduzida dos picornavírus é relativamente curta e possui estruturas que controlam a síntese de RNA viral (RACANIELLO, 2007).

Os picornavírus entéricos suínos (PEV) eram classificados como pertencentes ao gênero *Enterovirus*, que agrupava ao menos 13 sorotipos distintos, denominados PEV1 a PEV13, de acordo com testes de imunofluorescência indireta (IFI) e vírus neutralização (VN) (AUERBACH et al., 1994; KAKU; SARAI; MURAKAMI, 2001). Estes sorotipos também eram divididos em três grupos (I, II e III), com base nos efeitos citopáticos produzidos em células renais suínas, nas propriedades físico-químicas e na diferente gama de células hospedeiras (KAKU; SARAI; MURAKAMI, 2001).

Estudos baseados nas características biológicas e moleculares dos enterovirus suínos levaram à sua reclassificação em três gêneros distintos. O PEV1 a PEV7 e PEV11 a PEV13 (grupo I) foram definidos como diferentes sorotipos de uma única espécie viral, denominada teschovirus suíno (*porcine teschovirus* - PTV), e classificado no gênero *Teschovirus* (KAKU; SARAI; MURAKAMI, 2001; ZELL et al., 2001). O PEV8 (grupo II) foi definido como espécie e nomeado enterovirus suíno A (*porcine enterovirus* A – PEV-A) e, posteriormente, renomeado como sapelovirus suíno (*porcine sapelovirus* - PSV) dentro do novo gênero *Sapelovirus* (KRUMBHOLZ et al., 2002). Os sorotipos PEV9 e PEV10 (grupo III) foram mantidos no gênero *Enterovirus*, porém foram renomeados como uma única espécie denominada enterovirus suíno B (*porcine enterovirus* B – PEV-B). Recentemente, as três espécies virais tiveram novamente suas nomenclaturas alteradas pela exclusão da

referência à espécie hospedeira, passando a ser denominadas teschovirus A (TV-A), sapelovirus A (SV-A) e enterovirus G (EV-G) (ICTV, 2014).

Os picornavírus entéricos suínos são estudados desde a década de 60. Inicialmente, os “enterovírus” foram descritos como agentes causais de doença neurológica grave (*Teschen disease*) e branda (*Talfan disease*) (OIE, 2008), e também de falhas reprodutivas (DUNNE et al., 1965). Posteriormente, os picornavírus entéricos foram isolados em animais com lesões vesiculares cutâneas semelhantes às da febre aftosa (NARDELLI et al., 1968; KNOWLES, 1988). A evolução dos métodos diagnósticos permitiu a distinção dos picornavírus entéricos, sendo atribuídas lesões específicas aos sorotipos e/ou espécies de picornavírus entéricos suínos.

A primeira evidência de infecção pelo TV-A foi a ocorrência da doença de Teschen, na Tchecoslováquia, atual República Tcheca, em 1930 (TREFNY, 1930). A doença caracteriza-se por um quadro de polioencefalomielite não supurativa, na maioria das vezes fatal, que acomete suínos de todas as idades (SALLES et al., 2011). Entre 1930 e 1950, a doença se disseminou pela Europa, causando importantes perdas econômicas (SALLES et al., 2011; YAMADA et al., 2014).

A doença de Teschen foi associada a um sorotipo particularmente mais virulento, o TV-A1 ou, de acordo com a antiga nomenclatura, PTV1. Vinte anos depois, a forma mais branda da doença e que praticamente não causava mortalidade foi descrita em Talfan, País de Gales (HARDING, DONE, KERSHAW, 1957).

Casos das doenças de Teschen e/ou Talfan foram relatados nos EUA (POGRANICHNIY et al., 2003; BANGARI et al., 2010), Canadá (SALLES et al., 2011), Haiti (DENG et al., 2012), República Dominicana (VENTURA et al., 2013) e em países da Ásia (YAMADA et al., 2004; TAKAHASHI et al., 2008; CHIU et al., 2012). Outros sorotipos de TV-A (2, 3 e 5) também já foram associados à forma branda de polioencefalomielite em suínos (POGRANICHNIY et al., 2003; DUBOVI; MACLACHLAN, 2011).

Além de doença neurológica, o TV-A foi associado a manifestações respiratórias, reprodutivas e entéricas (ALEXANDERSEN et al., 2012; LIN; CUI; ZELL, 2012; QIU et al., 2013). Entretanto, estudos têm demonstrado que infecções assintomáticas e/ou subclínicas por diferentes sorotipos de TV-A tornaram-se endêmicas nos rebanhos suínos (BANGARI et al., 2010; BUITRAGO et al., 2010; CHIU et al., 2012; PRODĚLALOVÁ, 2012; QIU et al., 2013; DONIN et al., 2014).

O SV-A se encontra amplamente disseminado entre rebanhos suinícolas. Na maioria das vezes, as infecções são assintomáticas e/ou subclínicas (BUITRAGO et al., 2010; PRODĚLALOVÁ, 2012; DONIN et al., 2014). Porém, o SV-A foi detectado pelas técnicas de RT-PCR e foi isolado em cultura celular durante um surto de gastroenterite associado a manifestações clínicas respiratórias e neurológicas que ocorreram em animais de 50 a 60 dias de idade (LAN et al., 2011). Neste mesmo estudo, animais inoculados experimentalmente reproduziram os sinais clínicos observados durante o surto e o SV-A passou a ser considerado um potencial agente etiológico de doenças entéricas, respiratórias e neurológicas em suínos. Estudos conduzidos na China (CHEN et al., 2012) e Reino Unido (SCHOCK et al., 2014) também associaram a infecção pelo SV-A com doenças entérica e neurológica, respectivamente.

Infecções pelo EV-G foram associadas a lesões vesiculares cutâneas em suínos (KNOWLES, 1988). O papel deste vírus como agente etiológico de doença entérica em suínos não está bem definido, uma vez que na maior parte dos estudos o EV-G foi detectado em animais assintomáticos (BOROS; PANKOVICS; REUTER, 2011; MOON et al., 2012; YANG et al., 2013). Em um estudo realizado no Vietnã, o EV-G foi detectado em amostras fecais de animais com e sem diarreia, porém não houve diferença significativa nas taxas de detecção de acordo com a consistência fecal, não sendo possível associar a presença do vírus com a ocorrência de diarreia (VAN DUNG et al., 2014). Em 2014, o EV-G foi descrito pela primeira vez nos EUA, sendo que apenas uma amostra fecal de um suíno com diarreia foi avaliada para a presença do vírus (ANBALAGAN; HESSE; HAUSE, 2014). No mesmo ano, no Brasil, o EV-G foi descrito pela primeira vez em amostras fecais de consistência normal e diarreicas de suínos das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (DONIN et al., 2014).

As infecções pelo TV-A têm sido descritas como as mais comuns, seguidas pelo SV-A e EV-G (ALEXANDERSEN et al., 2012). Entretanto, estudos realizados em diferentes países revelam que pode haver diferenças no comportamento epidemiológico das infecções por cada um dos vírus. Um estudo realizado na Espanha investigou 206 isolados virais obtidos a partir de amostras fecais de suínos assintomáticos e detectou o TV-A e SV-A em 97 (47%) e 18 (9%) dos isolados, respectivamente, mas o EV-G não foi detectado (BUITRAGO et al., 2010). Estudo realizado na Itália, entre as 40 amostras fecais de animais assintomáticos que foram avaliadas, 34 foram positivas para o TV-A, 14 para o SV-A e sete para o EV-G (SOZZI et al., 2010). Na China, um estudo avaliou a presença do EV-G em 447 amostras fecais de animais assintomáticos e apenas 8,3% (37/447) das amostras foram positivas para o vírus (YANG et al., 2013).

Em outro estudo, conduzido na República Tcheca, o EV-G foi mais frequentemente detectado (50,2%, 104/207) em suínos domésticos, seguido pelo TV-A (46,4%, 96/207) e SV-A (33,8%, 70/207) (PRODEĽALOVÁ, 2012). No Vietnã, altas taxas de detecção do EV-G (72,8%, 144/198) também foram descritas (VAN DUNG et al., 2014).

No Brasil, não houve diferença significativa nas taxas de detecção do TV-A (45%, 18/40) e EV-G (40%, 16/40), sendo que o SV-A foi o picornavírus entérico menos frequente (17,5%, 7/40) em amostras fecais de suínos domésticos (DONIN et al., 2014).

Os javalis também têm sido monitorados para as infecções pelo TV-A, SV-A e EV-G, uma vez que esta espécie animal, em vida livre ou em cativeiro, está presente em muitos países e atua como reservatório para vários agentes virais, bacterianos e parasitários que são transmissíveis para animais de produção, domésticos e para o homem (MENG; LINDSAY; SRIRANGANATHAN, 2009).

Em um estudo realizado na Espanha, 63 amostras fecais de javalis de vida livre foram coletadas durante 2007 e 2011, sendo 50,8% (32/63) positivas para o TV-A e 6,4% (4/63) para o SV-A (CANO-GÓMEZ et al., 2013). Outro estudo, realizado na República Tcheca, detectou TV-A (44,4%, 32/74), SV-A (27,8%, 20/72) e EV-G (69,4%, 50/72) nas amostras fecais de javalis de vida livre que foram coletadas entre 2005 e 2011, sendo que infecções mistas por dois (16,1% a 30,4%) ou três (17,9%) dos vírus investigados foram detectadas nas amostras (PRODEĽALOVÁ, 2012). Na Hungria, além da detecção do TV-A e EV-G, um novo genotipo de EV-G foi descrito em fezes de javalis de cativeiro (BOROS et al., 2012). Em todos os estudos citados, os animais eram assintomáticos.

No Brasil, amostras fecais de javalis de cativeiro foram investigadas para os picornavírus entéricos suínos, e os resultados demonstram que o EV-G foi o vírus mais frequentemente detectado (11/22), seguido pelo TV-A (10/22) e SV-A (4/22) (DONIN et al., 2015). Além de ser a primeira descrição dos picornavírus entéricos suínos em javalis na América do Sul, este estudo ainda avaliou pecaris (*Pecari tajacu* e *Tayassu pecari*) como possíveis hospedeiros alternativos para estes vírus, não sendo detectado nenhum dos três vírus nas 14 amostras fecais avaliadas.

Animais de todas as idades são suscetíveis às infecções pelos picornavírus entéricos suínos. Entretanto, as frequências de infecção pelo TV-A, SV-A e EV-G variam entre os diferentes grupos de idade e/ou categorias de produção. Boros et al. (2011) avaliaram no total 447 amostras fecais, que compreendiam animais de 10 dias, 30 dias e três meses de idade, para a presença do EV-G e detectou o vírus apenas nos animais de 10 dias. Já a investigação da infecção pelo EV-G em suínos com idade variando entre quatro e 26 semanas

revelou que animais entre 10 e 15 semanas estavam mais frequentemente infectados (YANG et al., 2013).

Um estudo na República Checa investigou a infecção pelo TV-A, SV-A e EV-G em animais de maternidade (< quatro semanas de idade), creche (quatro a 12 semanas de idade), terminação (seis meses de idade) e em animais adultos, detectando os três vírus em animais de todas as faixas etárias, com exceção do SV-A, que não foi detectado em animais adultos (PRODĚLALOVÁ, 2012). Por outro lado, o estudo realizado no Brasil relatou a detecção dos três picornavírus entéricos em animais de creche (quatro a oito semanas de idade), mas não detectou o SV-A em animais de maternidade (uma a três semanas de idade) (DONIN et al., 2014). As co-infecções com dois ou três picornavírus entéricos ocorrem em animais de todas as faixas etárias (PRODĚLALOVÁ, 2012; DONIN et al., 2014).

Estudos das infecções pelo TV-A, SV-A e EV-G em javalis de acordo com a idade dos animais são raros. Cano-Gómez et al. (2013) avaliaram amostras fecais de javalis para a infecção pelo TV-A e SV-A, entretanto a idade dos animais não foi informada. No estudo da República Tcheca, os javalis amostrados tinham até um ano de idade, porém os resultados não foram agrupados em categorias de idade (PRODĚLALOVÁ, 2012). Nos estudos realizados por Bóros et al. (2012a, 2012b) foram amostrados 10 javalis de seis ($n=5$) e oito ($n=5$) semanas de idade, com o TV-A sendo detectado em quatro e três amostras de cada grupo, respectivamente, e o EV-G em duas e três amostras de cada grupo, respectivamente. No estudo brasileiro, javalis ($n=22$) de dois grupos de idade foram avaliados e o TV-A, SV-A e EV-G foram mais frequentemente detectados nos animais de até sete meses de idade (9/14) em comparação com os javalis adultos (dois a quatro anos de idade, 3/8) (DONIN et al., 2015).

Os picornavírus entéricos suínos são transmitidos, principalmente, pela via fecal-oral, havendo replicação primária nas tonsilas e no trato digestório (DUBOVI; MACLACHLAN, 2011; ALEXANDERSEN et al., 2012). Contudo, um estudo baseado em múltiplos modelos de patogênese do TV-A em animais endemicamente infectados destaca as infecções intranasal e ascendente retrógrada, a partir das tonsilas, como igualmente importantes à via fecal-oral de transmissão para a patogênese deste vírus (CHIU et al., 2014).

Animais expostos ao TV-A desenvolvem resposta imunológica humoral protetora, pelo menos por alguns meses, ao passo que a resposta imune celular em animais experimentalmente infectados demonstrou-se fraca, localizada e não associada com atividade antiviral significativa (ALEXANDERSEN et al., 2012). Em um estudo experimental, suínos infectados com o TV-A foram tratados com ciclofosfamida, a imunossupressão induzida

resultou na ausência de resposta imune humoral (sorológica) e à infecção persistente dos animais, que apresentaram diarreia e, em um caso, sinais neurológicos (DERBYSHIRE, 1983).

Pogranichniy e colaboradores (2003) conduziram um estudo sorológico longitudinal em um rebanho suíno que apresentava um surto prolongado de polioencefalomielite, causada pelo TV-A sorotipo 5 ou 6, em animais na fase de creche. Os resultados revelaram que a maioria dos leitões apresentavam altos títulos de anticorpos neutralizantes específicos contra o sorotipo de TV-A identificado naquela granja aos seis/sete dias de idade, provavelmente de origem colostrálica. Aos 22 dias de idade, foi observada a queda dos títulos de anticorpos, o que coincidiu com o aparecimento de doença neurológica e aumento das taxas de mortalidade entre os animais de três a quatro semanas de idade. Aos 44 dias de idade, os títulos de anticorpos específicos voltaram a subir, sugerindo a exposição dos animais aquele sorotipo de TV-A.

A resposta humoral foi apontada como a mais importante para a proteção contra a infecção pelo TV-A, e a possível ocorrência de imunidade cruzada entre os vários sorotipos do vírus (ALEXANDERSEN et al., 2012).

Entre os diferentes testes diagnósticos que podem ser utilizados para a detecção da infecção pelo TV-A, SV-A e EV-G estão a VN, ELISA direto e indireto, imunofluorescência direta (IFD) e IFI, isolamento viral em cultivo celular, hibridização *in situ*, imunohistoquímica (IHQ), reação em cadeia da polimerase seguida da transcrição reversa (RT-PCR) e RT-PCR quantitativa (KRUMBHOLZ et al., 2003; YAMADA et al., 2007, 2008; QIU et al., 2013; CHIU et al., 2014). Os testes sorológicos não têm muito valor diagnóstico, a não ser que amostras pareadas de soro estejam disponíveis e que se conheça o sorotipo circulante; neste caso a VN é o teste sorológico mais recomendado (KRUMBHOLZ et al., 2003).

Sabe-se que as infecções entéricas estão entre as doenças mais frequentes na produção suinícola, sendo responsáveis por importantes perdas econômicas no setor, resultando em sequelas permanentes ou transitórias no trato gastrointestinal, ocasionando expressivo atraso no crescimento, redução do ganho de peso, mortalidade e gastos com medicamentos. Neste contexto temos o TV-A, SV-A e EV-G que são considerados importantes agentes etiológicos causadores de distúrbios entéricos, respiratórios, reprodutivos e neurológicos em animais jovens e adultos. Como vários agentes etiológicos podem causar os mesmos distúrbios, utilizam-se as técnicas moleculares, por serem rápidas para proporcionar um diagnóstico diferencial.

2.1 REFERÊNCIAS

- ALEXANDERSEN, S.; KNOWLES, N.J.; DEKKER, A.; BELSHAM, G.J.; ZHANG, Z.; KOENEN, F. Picornaviruses. In: ZIMMERMAN, J.J.; KARRIKER, L.A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K.; STEVENSON, G.W. (Ed.). **Diseases of Swine**. 10th ed. Ames, Iowa, USA: Wiley-Blackwell, 2012. cap. 42, p. 587-620.
- ANBALAGAN, S.; HESSE, R.A.; HAUSE, B.M. First identification and characterization of porcine enterovirus G in the United States. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e97517, 2014.
- AUERBACH, J.; PRAGER, D.; NEUHAUS, S.; LOSS, U.; WITTE, K.H. Grouping of porcine enteroviruses by indirect immunofluorescence and description of two new serotypes. **Zentralbl Veterinarmed B**, v. 41, n. 4, p. 277-282, 1994.
- BANGARI, D.S.; POGRANICHNIY, R.M.; GILLESPIE, T.; STEVENSON, G.W. Genotyping of porcine teschovirus from nervous tissue of pigs with and without polioencephalomyelitis in Indiana. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 4, p. 594-597, 2010.
- BOROS, Á.; PANKOVICS, P.; REUTER, G. Characterization of a novel porcine enterovirus in domestic pig in Hungary. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 1096-1102, 2011.
- BOROS, Á.; NEMES, C.; PANKOVICS, P.; KAPUSINSZKY, B.; DELWART, E.; REUTER, G. Porcine teschovirus in wild boars in Hungary. **Archives of Virology**, v. 157, n. 8, p. 1573-1578, 2012a.
- BOROS, Á.; NEMES, C.; PANKOVICS, P.; BÍRÓ, H.; KAPUSINSZKY, B.; DELWART, E.; REUTER, G. Characterization of a novel porcine enterovirus in wild boars in Hungary. **Archives of Virology**, v. 157, n. 5, p. 981-986, 2012b.
- BUITRAGO, D.; CANO-GÓMEZ, C.; AGÜERO, M.; FERNANDEZ-PACHECO, P.; GÓMEZ-TEJEDOR, C.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M.Á. A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 5, p. 763-766, 2010.
- CANO-GÓMEZ, C.; GARCÍA-CASADO, M.A.; TÓPICOS em sanidade e manejo de suínos SORIGUER, R.; PALERO, F.; JIMÉNEZ-CLAVERO, M.A. Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 165, n. 1-2, p. 115-122, 2013.
- CHEN, J.; CHEN, F.; ZHOU, Q.; LI, W.; SONG, Y.; PAN, Y.; ZHANG, X.; XUE, C.; BI, Y.; CAO, Y. Complete genome sequence of a novel porcine sapelovirus strain YC2011 isolated from piglets with diarrhea. **Journal of Virology**, v. 86, n. 19, p. 10898, 2012.
- CHIU, S.-C.; HU, S.-C.; CHANG, C.-C.; CHANG, C.-Y.; HUANG, C.-C.; PANG, V.F.; WANG, F.-I. The role of porcine teschovirus in causing diseases in endemically infected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 12, p. 88-95, 2012.

CHIU, S.C.; YANG, C.L.; CHEN, Y.M.; HU, S.C.; CHIU, K.C.; LIN, Y.C.; CHANG, C.Y.; WANG, F.I. Multiple models of porcine teschovirus pathogenesis in endemically infected pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 69-77, 2014.

DENG, M.Y.; MILLIEN, M.; JACQUES-SIMON, R.; FLANAGAN, J.K.; BRACHT, A.J.; CARRILLO, C.; BARRETTE, R.W.; FABIAN, A.; MOHAMED, F.; MORAN, K.; ROWLAND, J.; SWENSON, S.L.; JENKINS-MOORE, M.; KOSTER, L.; THOMSEN, B.V.; MAYR, G.; PYBURN, D.; MORALES, P.; SHAW, J.; BURRAGE, T.; WHITE, W.; MCINTOSH, M.T.; METWALLY, S. Diagnosis of Porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 4, p. 671-678, 2012.

DERBYSHIRE, J.B. The effect of immunosuppression with cyclophosphamide on an experimental porcine enterovirus infection in piglets. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 47, n. 2, p. 235-7, 1983.

DONIN, D.G.; DE ARRUDA LEME, R.; ALFIERI, A.F.; ALBERTON, G.C.; ALFIERI, A.A. First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, p. 523-528, 2014.

DONIN, D.G.; DE ARRUDA LEME, R.; ALFIERI, A.F.; ALBERTON, G.C.; ALFIERI, A.A. Molecular survey of porcine teschovirus, porcine sapelovirus, and enterovirus G in captive wild boars (*Sus scrofa scrofa*) of Paraná state, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2015. *In press*.

DUBOVI, N.J.; MACLACHLAN, E.J. Chapter 26 - Picornaviridae. In: DUBOVI, N.J.; MACLACHLAN, E.J. (Ed.). **Fenner's Veterinary Virology (Fourth Edition)** ed. San Diego: Academic Press, <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-375158-4.00026-2>. 2011. p. 425-441. ISBN 978-0-12-375158-4.

DUNNE, H.W.; GOBBLE, J.L.; HOKANSON, J.F.; KRADEL, D.C.; BUBASH, G.R. Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 26, n. 115, p. 1284-1297, 1965.

HARDING, J.D.J., DONE, J.T. AND KERSHAW, G.F. A transmissible polioencephalomyelitis of pigs (Talfan disease). **Veterinary Record**. v. 69, p. 824-832, 1957.

ICTV. Virus taxonomy: 2014 release. 2014. Disponível em: < <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> >. Acesso em: 16 de Março 2015.

KAKU, Y.; SARAI, A.; MURAKAMI, Y. Genetic reclassification of porcine enteroviruses. **Journal of General Virology**, v. 82, n. 2, p. 417-424, 2001.

KNOWLES, N.J. The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue. **Veterinary Record**, v. 122, n. 18, p. 441-442, 1988.

KRUMBHOLZ, A.; DAUBER, M.; HENKE, A.; BIRCH-HIRSCHFELD, E.; KNOWLES, N.J.; STELZNER, A.; ZELL, R. Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. **Journal of Virology**, v. 76, n. 11, p. 5813-5821, 2002.

KRUMBHOLZ, A.; WURM, R.; SCHECK, O.; BIRCH-HIRSCHFELD, E.; EGERER, R.; HENKE, A.; WUTZLER, P.; ZELL, R. Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. **Journal of Virological Methods**, v. 113, n. 1, p. 51-63, 2003.

LAN, D.; JI, W.; YANG, S.; CUI, L.; YANG, Z.; YUAN, C.; HUA, X. Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain. **Archives of Virology**, v. 156, n. 9, p. 1567-1574, 2011.

LIN, W.; CUI, S.; ZELL, R. Phylogeny and evolution of porcine teschovirus 8 isolated from pigs in China with reproductive failure. **Archives of Virology**, v. 157, n. 7, p. 1387-1391, 2012.

MENG, X.J.; LINDSAY, D.S.; SRIRANGANATHAN, N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1530, p. 2697-2707, 2009.

MOON, H.-J.; SONG, D.; SEON, B.H.; KIM, H.-K.; PARK, S.-J.; AN, D.-J.; KIM, J.-M.; KANG, B.-K.; PARK, B.-K. Complete genome analysis of porcine enterovirus B isolated in Korea. **Journal of Virology**, v. 86, n. 18, p. 10250, 2012.

NARDELLI, L.; LODETTI, E.; GALANDI, G.L.; BURROWS, R.; GOODRIDGE, D.; BROWN, F.; CARTWRIGHT, B. A foot and mouth disease syndrome in pigs caused by an Enterovirus. **Nature**, v. 219, n. 5160, p. 1275-1276, 1968.

OIE. Teschovirus encephalomyelitis: Organização Mundial de Saúde Animal, 2008. cap. 2.8.10, p. 1146-1152.

POGRANICHNIY, R.M.; JANKE, B.H.; GILLESPIE, T.G.; YOON, K.J. A prolonged outbreak of polioencephalomyelitis due to infection with a group I porcine enterovirus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 2, p. 191-194, 2003.

PRODĚLALOVÁ, J. The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1447-1451, 2012.

QIU, Z.; WANG, Z.; ZHANG, B.; ZHANG, J.; CUI, S. The prevalence of porcine teschovirus in the pig population in northeast of China. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 1, p. 209-214, 2013.

RACANIELLO, V.R. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (Ed.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, v.I, 2007. cap. 24, p. 796-838.

SALLES, M.W.S.; SCHOLE, S.F.E.; DAUBER, M.; STREBELOW, G.; WOJNAROWICZ, C.; HASSARD, L.; ACTON, A.C.; BOLLINGER, T.K. Porcine teschovirus polioencephalomyelitis in western Canada. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 2, p. 367-373, 2011.

SCHOCK, A.; GURRALA, R.; FULLER, H.; FOYLE, L.; DAUBER, M.; MARTELLI, F.; SCHOLE, S.; ROBERTS, L.; STEINBACH, F.; DASTJERDI, A. Investigation into an outbreak of encephalomyelitis caused by a neuroinvasive porcine sapelovirus in the United Kingdom. **Veterinary Microbiology**, v. 172, n. 3-4, p. 381-389, 2014.

SOZZI, E.; BARBIERI, I.; LAVAZZA, A.; LELLI, D.; MORENO, A.; CANELLI, E.; BUGNETTI, M.; CORDIOLI, P. Molecular characterization and phylogenetic analysis of VP1 of porcine enteric picornaviruses isolates in Italy. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 6, p. 434-442, 2010.

TAKAHASHI, M.; SEIMIYA, Y.M.; SEKI, Y.; YAMADA, M. A piglet with concurrent polioencephalomyelitis due to porcine teschovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 70, n. 5, p. 497-500, 2008.

TREFNY, L. Massive illness of swine in Teschen area. **Zverolek Obz.** V. 23, P. 235-236, 1930.

VAN DUNG, N.; ANH, P.H.; VAN CUONG, N.; HOA, N.T.; CARRIQUE-MAS, J.; HIEN, V.B.; CAMPBELL, J.; BAKER, S.; FARRAR, J.; WOOLHOUSE, M.E.; BRYANT, J.E.; SIMMONDS, P. Prevalence, genetic diversity and recombination of species G enteroviruses infecting pigs in Vietnam. **The Journal of General Virology**, v. 95, n. Pt 3, p. 549-556, 2014.

VENTURA, A.; GONZALEZ, W.; BARRETTE, R.; SWENSON, S.; BRACHT, A.; ROWLAND, J.; FABIAN, A.; MORAN, K.; MOHAMED, F.; O'HEARN, E.; JENKINS-MOORE, M.; TOMS, D.; SHAW, J.; MORALES, P.; PYBURN, D.; CARRILLO, C.; MAYR, G.; MCINTOSH, M.; DENG, M. Virus and antibody diagnostics for swine samples of the Dominican Republic collected in regions near the border to Haiti. **ISRN Virology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

YAMADA, M.; KOZAKURA, R.; IKEGAMI, R.; NAKAMURA, K.; KAKU, Y.; YOSHII, M.; HARITANI, M. Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus. **Veterinary Record**, v. 155, n. 10, p. 304-306, 2004.

YAMADA, M.; KAKU, Y.; NAKAMURA, K.; YOSHII, M.; YAMAMOTO, Y.; MIYAZAKI, A.; TSUNEMITSU, H.; NARITA, M. Immunohistochemical detection of porcine teschovirus antigen in the formalin-fixed paraffin-embedded specimens from pigs experimentally infected with porcine teschovirus. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 54, n. 10, p. 571-574, 2007.

YAMADA, M.; KOZAKURA, R.; KAKU, Y.; NAKAMURA, K.; YAMAMOTO, Y.; YOSHII, M.; MIYAZAKI, A.; TSUNEMITSU, H.; NARITA, M. Immunohistochemical distribution of viral antigens in pigs naturally infected with porcine teschovirus. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 70, n. 3, p. 305-308, 2008.

YAMADA, M.; MIYAZAKI, A.; YAMAMOTO, Y.; NAKAMURA, K.; ITO, M.; TSUNEMITSU, H.; NARITA, M. Experimental teschovirus encephalomyelitis in gnotobiotic pigs. **Journal of comparative pathology**, v. 150, n. 2-3, p. 276-286, 2014.

YANG, S.; WANG, Y.; SHEN, Q.; ZHANG, W.; HUA, X. Prevalence of porcine enterovirus 9 in pigs in middle and eastern China. **Virology Journal**, v. 10, p. 99, 2013.

ZELL, R.; DAUBER, M.; KRUMBHOLZ, A.; HENKE, A.; BIRCH-HIRSCHFELD, E.; STELZNER, A.; PRAGER, D.; WURM, R. Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. **Journal of Virology**, v. 75, n. 4, p. 1620-1631, 2001.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a excreção fecal do *Teschovirus A* (TV-A), *Sapelovirus A* (SV-A) e *Enterovirus G* (EV-G) em leitões lactentes e desmamados naturalmente infectados provenientes de uma granja suinícola localizada em Guarapuava, Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a presença do *Teschovirus A* (TV-A), *Sapelovirus A* (SV-A) e *Enterovirus G* (EV-G), utilizando a técnica de RT-PCR e *nested*-PCR, em amostras fecais de suínos amostradas durante a fase de maternidade (duas a três semanas de idade) e reamostradas durante a fase de creche (quatro a seis semanas de idade).
- Comparar a frequência dos vírus nos mesmos animais em cada uma das fases de produção.

3 ARTIGO A

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da *Veterinary Research Communications*.

Disponível em: <http://www.springer.com/life+sciences/animal+sciences/journal/11259>

ORIGINAL RESEARCH

Longitudinal survey of *teschovirus A*, *sapelovirus A*, and *enterovirus G* fecal excretion from naturally infected suckling and weaned pigs

Danilo Ratti da Silva¹, Alice Fernandes Alfieri¹, Amauri Alcindo Alfieri^{1*}

¹Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Parana, Brazil

Mailing address: Rodovia Celso Garcia Cid - Campus Universitário.

CEP 86057-970 - Londrina – PR, Brazil PO Box 10011.

Phone number: +55 43 33715876. **Fax:** +55 43 33714485.

*Corresponding author: alfieri@uel.br

Abstract

Teschovirus A (TV-A), *sapelovirus A* (SV-A), and *enterovirus G* (EV-G) are infectious agents specific to pig specie that are endemically spread worldwide. The aim of this study was to assess the longitudinal porcine enteric picornavirus fecal excretion from naturally infected pigs at suckling and nursery ages. Fecal samples ($n=34$) of solid to liquid consistency from 17 pigs at suckling (2-3 weeks old) and nursery (4-6 weeks old) categories from a single pig herd of Guarapuava city, Parana, were evaluated for TV-A, SV-A, and EV-G presence. Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested-PCR (n-PCR) assays targeting the 5' non-translated region of the genome of each of the viruses were used for screening the viruses. Porcine enteric picornaviruses were detected in 14 out of the 17 nursery pig fecal evaluated. Fecal samples from animals during the suckling age tested were negative for the 3 enteric picornaviruses. The fecal samples from these same pigs at nursery age were positive for EV-G (14/17), TV-A (12/17), and SV-A (9/17). Single EV-G (2/17), double TV-A + EV-G (3/17), and triple TV-A + SV-A + EV-G (9/17) fecal excretion were detected. Sequencing analysis with the related viruses showed nucleotide similarities varying from 96.1% to 99.3% for TV-A, 96.1% to 99% for SV-A, and 88.4% to 99.6% for EV-G. This study represents the first longitudinal survey based on the porcine enteric picornavirus fecal excretion and revealed that the shedding of these viruses increased with the age of the animals, showing that the horizontal pig-to-pig transmission is an important route for the porcine enteric picornavirus dissemination.

Keywords: Swine, *Picornaviridae*, porcine enterovirus, fecal shedding.

Introduction

The *Picornaviridae* family is divided into 29 genera which includes viruses of importance to human and animal health. The viruses of this family are small, non-enveloped, and have a single-stranded positive-sense RNA (ssRNA) genome (ICTV 2014). Porcine enteric picornaviruses were previously classified into the *Enterovirus* genus. Studies on the biological and molecular features of porcine enteroviruses led to their reclassification into *teschovirus A* (TV-A), *sapelovirus A* (SV-A), and *enterovirus G* (EV-G), each belonging to three distinct genera (Kaku et al. 2001; Zell et al. 2001; Krumbholz et al. 2002; ICTV 2014).

Porcine enteric picornaviruses have been reported in domestic pigs and wild boars in Asia (Kaku et al. 2007; Lan et al. 2011; Lin et al. 2012; Moon et al. 2012; Zhang et al. 2012), Europe (Zell et al. 2000; La Rosa et al. 2006; Buitrago et al. 2010; Sozzi et al. 2010; Boros et al. 2011; Prođělalová 2012; Cano-Gómez et al. 2013), North America (Bangari et al. 2010; Salles et al. 2011; Shan et al. 2011), Central America (Deng et al. 2012; Ventura et al. 2013) and South America (Donin et al. 2014; Donin et al. 2015).

Pigs of all ages are susceptible to infection with TV-A, SV-A, and EV-G, which are viruses that circulate worldwide in asymptomatic domestic pigs (Prođělalová 2012). However, depending on the virus serotype and infection conditions, these picornaviruses may be considered important etiological agents of enteric, respiratory, reproductive, or neurological disorders in young and adult animals (Krumbholz et al. 2003). Clinical manifestations may include diarrhea, pneumonia, fever, vesicular diseases, reproductive failure (SMEDI syndrome - Stillbirth, Mummification, Embryonic Death and Infertility), myocarditis, and polioencephalomyelitis (Krumbholz et al. 2003).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested-PCR (n-PCR) assays have performed to detect the RNA of these viruses primarily from pig feces and also

from tissue samples (Bangari et al. 2010; Buitrago et al. 2010; Lan et al. 2011; Alexandersen et al. 2012; Chiu et al. 2012;). To date, little information on the epidemiology of TV-A, SV-A, and EV-G infections are available in Brazil and there are no longitudinal studies in Brazil based on the enteric picornavirus infections and fecal excretion. Considering that suckling and weaned pigs are included in the producing categories with higher susceptibility animals to enteric virus infections, pigs belonging to these age groups were the target in this investigation. The aim of this study was to evaluate the dynamics of TV-A, SV-A, and EV-G excretion from feces of naturally infected piglets and weaned pigs under field conditions.

Materials and methods

Fecal samples and pig herd

Sampling included in this study were derived from a collection of pig feces collected in a single multi-site pig production farm located in Guarapuava city (25°23'43"S, 51°27'29"W), central-southern region of Parana state, Brazil, from June to August, 2012, and stored at -80°C.

The farm consisted of three sites. Site 1 housed breeders, gestating, and farrowing sows, as well as suckling piglets up to 3 weeks of age. At fourth week of age, piglets were weaned and moved to site 2, where they were housed until 8 weeks old. Site 3 was a grower-to-finish unit where 9 to 24-week-old animals were raised. Animals were raised with good nutritional and sanitary practices, including “all-in all-out” management. Reproductive management was done by artificial insemination.

Fecal samples were according to the age of the animals. Solid, pasty and liquid consistency fecal samples ($n=34$) from 17 animals that were sampled during the suckling

category (2 to 3 weeks old) and resampled later at nursery (4 to 6 weeks old) were included in this survey. Piglets were from seven non-vaccinated and seven vaccinated sows for Rotavirus A.

RNA extraction

Fecal suspensions were prepared at 10 to 20% (w/v) in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) and centrifuged at 5,000 x g for 3 min. The supernatants were used for nucleic acid extraction.

The nucleic acid were extracted using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate extraction methods (Boom et al. 1990; Alfieri et al. 2006). The nucleic acid was eluted in 50 µl of ultra-pure RNase-free diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water and stored at -20°C until use. Fecal samples BRA/UEL1/11, BRA/UEL-WB20/13, and BRA/UEL4/13, previously known as positive for TV-A, SV-A, and EV-G (Donin et al. 2014; Donin et al. 2015), and an aliquot of ultrapure autoclaved water were included as positive and negative controls, respectively, during the nucleic acid extraction and the following procedures.

Teschovirus A, sapelovirus A and enterovirus G detection

The presence of TV-A, SV-A, and EV-G was determined using previously described n-PCR assays targeting the 5'-non-translated region (5'-NTR) of the virus genomes (Krumbholz et al. 2003), with modifications (Donin et al. 2014). The expected sizes of the amplified products were 158, 212, and 313 for TV-A, SV-A, and EV-G, respectively.

Sequencing and phylogenetic analysis

Two TV-A, 3 SV-A, and 3 EV-G n-PCR amplicons, were selected for sequencing analysis to confirm the identity of the amplified products. Amplicons were purified with the PureLink[®] Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen[™] Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), quantified with Qubit[™] Fluorometer (Invitrogen[™] Life Technologies, Eugene, OR, USA), and sequenced in both directions with forward and reverse primers used in the n-PCR in an ABI 3500 Genetic Analyzer with the BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, USA). Sequence quality analyses and consensus sequences were obtained using Phred and CAP3 softwares, respectively (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) and sequences were used only with higher quality ≥ 20 . Similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool - BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A phylogenetic tree based on nucleotide (nt) was obtained using the Maximum Likelihood statistical method based on the Kimura 2-parameter model (MEGA 6), which provided statistical support via bootstrapping with 1,000 replicates. Sequence identity matrix was performed using BioEdit software version 7.1.11 (Hall 1999).

Results

The 17 fecal samples from suckling piglets tested were negative for the 3 porcine enteric picornaviruses evaluated in this study. Among the 17 feces that were collected from the same animals during the nursery age, only 3 were negative for all viruses. Twelve of the fecal samples from the weaned pigs were positive for TV-A, 9 for SV-A, and 14 for EV-G.

Single EV-G excretion was detected only in 2 fecal samples evaluated. Double (TV-A and EV-G) and triple (TV-A, SV-A, and EV-G) virus excretion were detected in 3 and 9 fecal samples, respectively. The results according to the age at which animals were sampled and the feces consistency at the moment of collection are presented in Table 1.

Table 1 Single and mixed *Teschovirus A* (TV-A), *Sapelovirus A* (SV-A), and *Enterovirus G* (EV-G) fecal excretion detected by n-PCR assays in a longitudinal survey from pigs at suckling and nursery ages.

Porcine enteric picornaviruses	Age group / Fecal consistency						TOTAL (n=34)
	Suckling (n=17)			Nursery (n=17)			
	Solid (n=9)	Pasty (n=6)	Liquid (n=2)	Solid (n=3)	Pasty (n=11)	Liquid (n=3)	
TV-A	-	-	-	-	-	-	-
SV-A	-	-	-	-	-	-	-
EV-G	-	-	-	1	1	-	2
TV-A + SV-A	-	-	-	-	-	-	-
TV-A + EV-G	-	-	-	-	2	1	3
SV-A + EV-G	-	-	-	-	-	-	-
TV-A + SV-A + EV-G	-	-	-	1	6	2	9
TOTAL	0	0	0	2	9	3	14

TV-A = Teschovirus A; SV-A = Sapelovirus A; EV-G = Enterovirus G; - = negative samples

Sequencing analysis confirmed the specificity of TV-A, SV-A, and EV-G amplicons. The TV-A nucleotide sequences described in this study (BRA/UEL-DT508/12 and BRA/UEL-DT565/12) are shorter than 200 bp and therefore were not submitted to the GenBank (supplementary material). The TV-A sequences here in were 97.4% nt identity to each other and presented nt identical varying of 96.1% to 99.3% with TV-A strains of Brazil and other countries. The SV-A nt sequences in this study (BRA/UEL-DS417/12, BRA/UEL-DS508/12, and BRA/UEL-DS509/12; GenBank accession numbers KR139669, KR139670, and KR139671, respectively) were 100% identical to each other and showed 96.1% to 99% similarity with SV-A nt sequences available in GenBank, including Brazilian strains. Finally, the EV-G nt sequences herein (BRA/UEL-DE418/12, BRA/UEL-DE508/12, and BRA/UEL-

DE605/12; GenBank accession numbers KR139672, KR139673, and KR139674, respectively) were 99.6% to 100% identity to each other and had 88.4% to 99.6% nt similarity with other Brazilian and foreign EV-G strains. The phylogenetic tree shows the genetic relationship of the porcine enteric picornavirus strains in this study with the related viruses (Fig. 1).

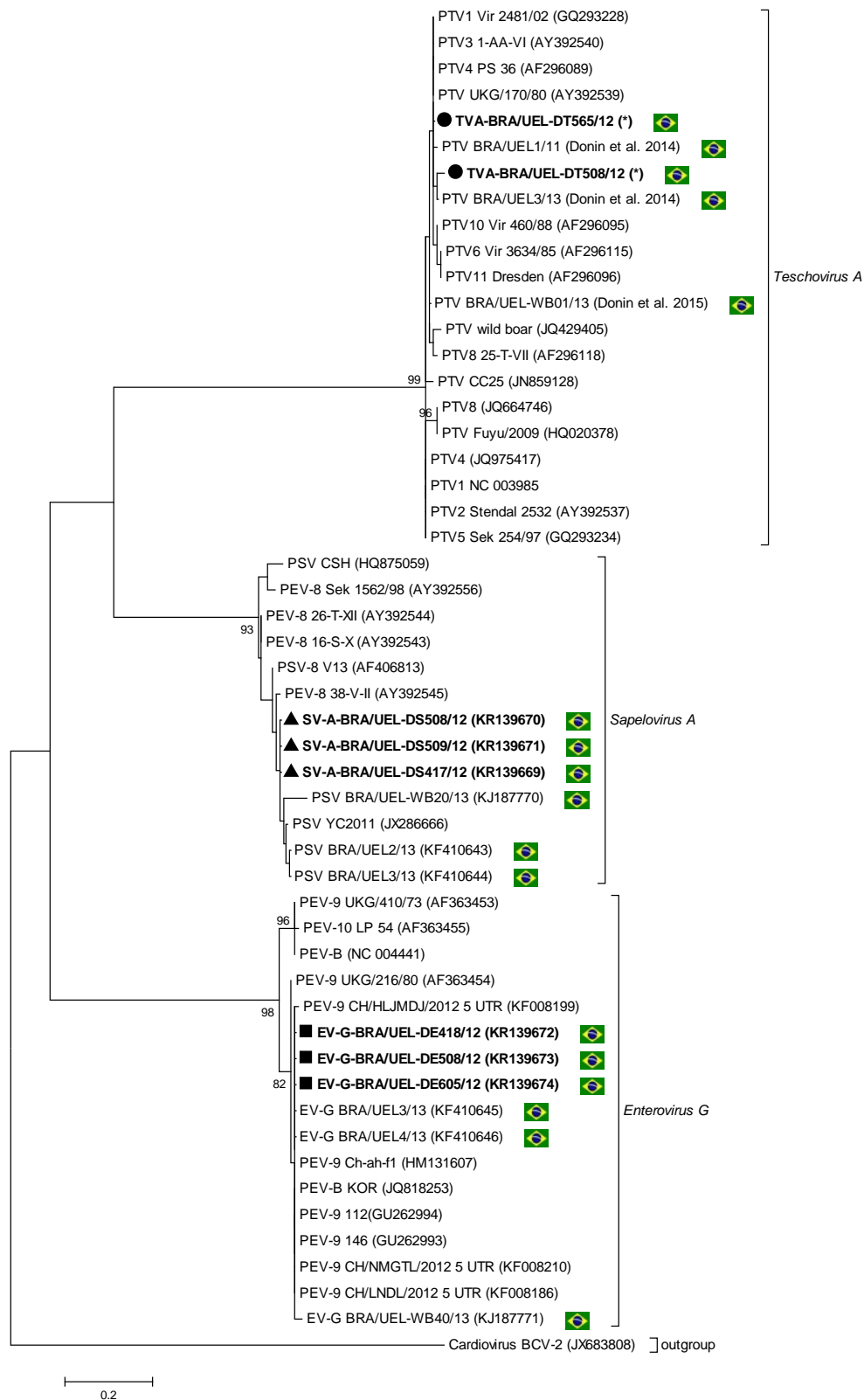


Fig. 1 Genetic relationship of *Teschovirus A* (TV-A), *Sapelovirus A* (SV-A), and *Enterovirus G* (EV-G). Brazilian strains and other published sequences which represent the related viruses. Maximum Likelihood phylogenetic tree construction using the Kimura 2-parameter

model based on partial 5'-non-translated region of the porcine enteric picornavirus strains. GenBank accession numbers of representative sequences, TV-A (●BRA/UEL-DT508/12;●BRA/UEL-DT565/12), SV-A (▲BRA/UEL-DS417/12; ▲BRA/UEL-DS508/12; ▲BRA/UEL-DS509/12), and EV-G (■BRA/UEL-DE418/12; BRA/UEL-DE508/12; ■BRA/UEL-DE605/12) sequences in this study, and other Brazilian strains presented herein are indicated between parentheses. Bootstrap values (1,000 replicates) higher than 70% are shown. (*) refer to TV-A nt sequences < 200 bp; the TV-A sequences are available as supplementary material.

Discussion

This first Brazilian longitudinal analysis for porcine enteric picornavirus fecal shedding showed that animals in the suckling age were not excreting TV-A, SV-A, and EV-G in feces, the virus shedding being detected in the same sampled pigs at nursery age.

Studies conducted in Hungary (Boros et al. 2011), Czech Republic (Prodělalová 2012), China (Yang et al. 2013), and Vietnam (Van Dung et al. 2014) reported pigs at different ages susceptible to TV-A, SV-A, and EV-G infections; however the prevalence of these viruses varied within the age-groups. A previous Brazilian porcine enteric picornavirus-based study reported suckling piglets of distinct Brazilian geographical regions as positive for TV-A and EV-G infections, while SV-A was not detected in this age group (Donin et al. 2014). Although in that study suckling piglets were positive for the viruses, porcine enteric picornavirus infections were less frequent in 1 to 3 weeks old animals than in pigs of 4 to 8 weeks old of age (Donin et al. 2014).

Studies have reported that TV-A is the most abundant porcine enteric picornavirus in pig feces, followed by SV-A, while the EV-G has been reported as the less common enteric picornavirus (Buitrago et al. 2010; Alexandersen et al. 2012). The porcine enteric

picornavirus-based studies conducted in Brazil, including the present one, revealed PTV was detected most frequently (45 %, 18/40), followed by EV-G (40 %, 16/40). PSV was the less (17.5%, 7/40) common virus present in the faecal samples evaluated and was not detected in the faecal suckling piglets (Donin et al., 2014). Already in another study by Donin et al. (2015), evaluating fecal samples from wild boars, the results reveal EV-G was most frequently (11/22, 50%) detected, Followed by PTV (10/22, 45.5%) and PSV (4/22 , 18.2%).

A possible explanation for the negative results from suckling piglets evaluated in this study is that these animals might not be with productive infection at the moment of the fecal collection. It is also likely that they have ingested good quality colostrum, with high titers of specific antibodies against TV-A, SV-A, and EV-G, providing lactogenic immunity and protection for litters against the early infection with these viruses. The negative results from all the piglets at suckling age in this study also suggest that the investigated viruses might not be circulating in this site of the herd, indicating that the sanitary conditions of the farm unit might have influenced the porcine enteric picornavirus infection rates in the farrow-to-weaning pig herd site.

Regarding the weaned animals, the post-weaning is a critical period of pig's life due to nutritional, environmental, and social changes. These facts and the decline in the passive antibodies may lead to poor animal health condition, becoming pigs more susceptible to infections. Additionally, the mixing of animals of different litters is a common management practice at nursery age (Kummer et al. 2009). These might be an explanation for the increasing of the porcine enteric picornavirus infections in animals at this age.

In this study porcine enteric picornavirus infections were shown to increase with the age of the animals, suggesting that pig-to-pig is an important route of TV-A, SV-A, and EV-G transmission. The role of sows as sources of porcine enteric picornavirus infections to piglets was not evaluated in this study. However, normal consistency fecal samples from lactating

sows ($n=3$) that had farrowed 4 of the piglets sampled in this study were investigated for the 3 studied viruses, which were not detected (data not shown). The TV-A, SV-A, and EV-G infection and excretion from sows during the gestational, farrowing, and lactation periods and of their offspring during the suckling age should be continuously monitored to assess the potential sow-to-piglet transmission of porcine enteric picornaviruses. Additionally, it is important to evaluate other source of virus shedding for sows, such as milk, for example.

Studies reported different clinical manifestations associated with TV-A, SV-A, and EV-G infections, including diarrhea (Knowles 2006; Chen et al. 2012; Anbalagan et al. 2014). Considering the overall detection rate for the investigated viruses from pasty to liquid consistency fecal samples in this study (12/22), it was not possible to relate the virus presence with diarrhea. Van Dung et al. (2014) detected EV-G in fecal samples from animals with and without diarrhea; however it was not possible to associate the presence of the virus with the occurrence of enteritis as there was no significant difference in the detection rates according to fecal consistency. In Brazil, the porcine enteric picornaviruses were more frequent in diarrheic fecal samples; although it was not possible to determine an association between illness and diarrhea due to the small number of samples evaluated (Donin et al. 2014). However, these viruses cannot be excluded as a causative agent of diarrhea. On the other hand, TV-A, SV-A, and EV-G RNA detection from solid fecal samples could indicate that porcine enteric picornaviruses were not always associated with the occurrence of diarrhea in this study. To properly assess the association of the virus presence with the occurrence of diarrhea is necessary to design a specific investigation, including the evaluation of infections with other porcine enteric viruses, such as rotaviruses, caliciviruses, picobirnavirus, *Aichivirus C*, *Torque teno sus virus* and hepatitis E, which are endemic in Brazilian pig herds (Alfieri et al. 1994, Barry et al. 2008; Zlotowski et al. 2008; de Arruda Leme et al. 2014; Ribeiro et al. 2013; Lorenzetti et al. 2014; Molinari et al. 2014; Silva et al. 2014).

Conclusion

In conclusion, to the author's knowledge this study represents the first longitudinal survey for enteric picornavirus fecal excretion from pigs in Brazil. The results indicated that TV-A, SV-A, and EV-G early infection was not a common event and that the horizontal transmission, primarily from pig-to-pig contact, is important for the maintenance of the virus circulation within a pig herd. TV-A, SV-A, and EV-G infections require continuous attention in pig herds since intestinal health is directly related to productivity.

Acknowledgements

The authors thank the following Brazilian Institutes for financial support: the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Financing of Studies and Projects (FINEP), and the Araucaria Foundation (FAP/PR). Alfieri, A.A. and Alfieri, A.F. are recipients of CNPq fellowships.

Animal Rights

This study is in agreement with the ethical principles complied by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Animals Use Ethics Committee (CEUA/protocol number 22/2013) of the Universidade Federal do Paraná – Palotina sector.

Conflict of Interest

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Alexandersen S, Knowles NJ, Dekker A, Belsham GJ, Zhang Z, Koenen F (2012) Picornaviruses, In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (Eds.), Diseases of Swine, 10th ed. (Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA), p. 587-620
- Alfieri AA, Alfieri AF, Freitas JC, Silva CA, Freire RL, Barros AR, Barreiros MAB, Müller EE (1994) Occurrence of Escherichia coli, Rotavirus, Picobirnavirus, and Cryptosporidium parvum in a postweaning diarrhoea focus in swine. Semin Cienc Agrar 15:5-7. doi: 10.5433/1679-0359.1994v15n1p5
- Alfieri AA, Parazzi ME, Takiuchi E, Médici KC, Alfieri AF (2006) Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002. Trop Anim Health Prod 38:521-526. doi: 10.1007/s11250-006-4349-9
- Anbalagan S, Hesse RA, Hause BM (2014) First identification and characterization of porcine enterovirus G in the United States. PloS one 9:e97517. doi: 10.1371/journal.pone.0097517
- Bangari DS, Pogranichniy RM, Gillespie T, Stevenson GW (2010) Genotyping of porcine teschovirus from nervous tissue of pigs with and without polioencephalomyelitis in Indiana. J Vet Diagn Invest 22:594-597. doi: 10.1177/104063871002200415
- Barry AF, Alfieri AF, Alfieri AA (2008) Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III, in Brazilian swine herds. Braz J Vet Res 28:82-86. doi: 10.1590/S0100-736X2008000100013
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol 28:495-503. doi: 0095-1137/90/030495-09\$02.00/0

- Boros Á, Pankovics P, Reuter G (2011) Characterization of a novel porcine enterovirus in domestic pig in Hungary. *Infect Genet Evol* 11:1096-1102. doi: 10.1016/j.meegid.2011.04.003
- Buitrago D, Cano-Gómez C, Agüero M, Fernandez-Pacheco P, Gómez-Tejedor C, Jiménez-Clavero MÁ (2010) A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain. *J Vet Diagn Invest* 22:763-766. doi: 10.1177/104063871002200519
- Cano-Gómez C, García-Casado MA, Soriguer R, Palero F, Jiménez-Clavero MA (2013) Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain. *Vet Microbiol* 165:115-122. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.11.022
- Chen J, Chen F, Zhou Q, Li W, Song Y, Pan Y, Zhang X, Xue C, Bi Y, Cao Y (2012) Complete genome sequence of a novel porcine sapelovirus strain YC2011 isolated from piglets with diarrhea. *J Virol* 86:10898. doi: 10.1128/jvi.01799-12
- Chiu S-C, Hu S-C, Chang C-C, Chang C-Y, Huang C-C, Pang VF, Wang F-I (2012) The role of porcine teschovirus in causing diseases in endemically infected pigs. *Vet Microbiol* 161:88-95. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.031
- de Arruda Leme R, Lorenzetti E, Alfieri AF, Alfieri AA (2014) Detection of Torque teno sus virus in diarrheic piglet fecal samples positive or negative for porcine group A rotavirus. *J Swine Health Prod* 22:287-290.
- Deng MY, Millien M, Jacques-Simon R, Flanagan JK, Bracht AJ, Carrillo C, Barrette RW, Fabian A, Mohamed F, Moran K, Rowland J, Swenson SL, Jenkins-Moore M, Koster L, Thomsen BV, Mayr G, Pyburn D, Morales P, Shaw J, Burrage T, White W, McIntosh MT, Metwally S (2012) Diagnosis of Porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti. *J Vet Diagn Invest* 24:671-678. doi: 10.1177/1040638712445769

- Donin DG, de Arruda Leme R, Alfieri AF, Alberton GC, Alfieri AA (2014) First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Trop Anim Health Prod* 46:523-528. doi: 10.1007/s11250-013-0523-z
- Donin DG, de Arruda Leme R, Alfieri AF, Alberton GC , Alfieri AA (2015) Molecular survey of porcine teschovirus, porcine sapelovirus, and enterovirus G in captive wild boars (*Sus scrofa scrofa*) of Paraná state, Brazil. *Braz J Vet Res* *In press*.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-98.
- ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses Virus taxonomy: 2014 release. <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>> Accessed in: March, 16 2015
- Kaku Y, Murakami Y, Sarai A, Wang Y, Ohashi S , Sakamoto K (2007) Antigenic properties of porcine teschovirus 1 (PTV-1) Talfan strain and molecular strategy for serotyping of PTVs. *Arch Virol* 152:929-940. doi: 10.1007/s00705-006-0908-7
- Kaku Y, Sarai A, Murakami Y (2001) Genetic reclassification of porcine enteroviruses. *J Gen Virol* 82:417-424.
- Knowles NJ, 2006. Porcine enteric picornaviruses, In: Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire S, Taylor DJ (Eds.), *Diseases of swine*, 9th ed. (Blackwell Publishing, Ames, Iowa), p. 337--345
- Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles NJ, Stelzner A, Zell R (2002) Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. *J Virol* 76:5813-5821. doi: 10.1128/jvi.76.11.5813-5821.2002
- Krumbholz A, Wurm R, Scheck O, Birch-Hirschfeld E, Egerer R, Henke A, Wutzler P, Zell R (2003) Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *J Virol Methods* 113:51-63. doi: 10.1016/S0166-0934(03)00227-1

- Kummer R, Gonçalves MAD, Lippke RT, Marques BMFPP; Mores TJ (2009) Fatores que influenciam o desempenho dos leitões na fase de creche. [Factors associated with nursery pig performance] *Acta Sci Vet* 37:195-209.
- La Rosa G, Muscillo M, Di Grazia A, Fontana S, Iaconelli M, Tollis M (2006) Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses. *J Vet Med B* 53:257-265. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00955.x
- Lan D, Ji W, Yang S, Cui L, Yang Z, Yuan C, Hua X (2011) Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain. *Arch Virol* 156:1567-1574. doi: 10.1007/s00705-011-1035-7
- Lin W, Cui S, Zell R (2012) Phylogeny and evolution of porcine teschovirus 8 isolated from pigs in China with reproductive failure. *Arch Virol* 157:1387-1391. doi: 10.1007/s00705-012-1315-x
- Lorenzetti E, Stipp DT, Possatti F, Campanha JET, Alfieri AF, Alfieri AA (2014) Diarrhea outbreaks in suckling piglets due to rotavirus group C single and mixed (rotavirus groups A and B) infections, *Braz J Vet Res* 34:391-397. doi: 10.1590/S0100-736X2014000500001
- Molinari BLD, Lorenzetti E, Otonel RAA, Alfieri AF, Alfieri AA (2014) Species H rotavirus detected in piglets with diarrhea, Brazil, 2012. *Emerg Infect Dis.* 20:1019-1022. doi: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.130776>
- Moon H-J, Song D, Seon BH, Kim H-K, Park S-J, An D-J, Kim J-M, Kang B-K, Park B-K (2012) Complete genome analysis of porcine enterovirus B isolated in Korea. *J Virol* 86:10250. doi: 10.1128/jvi.01548-12
- Prodělalová J (2012) The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011. *Infect Genet Evol* 12:1447-1451. doi: 10.1016/j.meegid.2012.04.025

- Ribeiro J, de Arruda Leme R, Alfieri AF, Alfieri AA (2013) High frequency of Aichivirus C (porcine kobuvirus) infection in piglets from different geographic regions of Brazil. *Trop Anim Health Prod* 45:1757-1762. doi: 10.1007/s11250-013-0428-x
- Salles MWS, Scholes SFE, Dauber M, Strebelow G, Wojnarowicz C, Hassard L, Acton AC, Bollinger TK (2011) Porcine teschovirus polioencephalomyelitis in western Canada. *J Vet Diagn Invest* 23:367-373. doi: 10.1177/104063871102300231
- Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Moeser A, Delwart E (2011) The fecal virome of pigs on a high-density farm. *J Virol* 85:11697-11708. doi: 10.1128/jvi.05217-11
- Silva PFN, Alfieri AF, Barry AF, de Arruda Leme R, Gardinali NR, van der Poel WHM, Alfieri AA (2014) High frequency of porcine norovirus infection in finisher units of Brazilian pig-production systems. *Trop Anim Health Prod* 47:237-241. doi: 10.1007/s11250-014-0685-3
- Sozzi E, Barbieri I, Lavazza A, Lelli D, Moreno A, Canelli E, Bugnetti M, Cordioli P (2010) Molecular characterization and phylogenetic analysis of VP1 of porcine enteric picornaviruses isolates in Italy. *Transbound Emerg Dis* 57:434-442. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01170.x
- Ventura A, Gonzalez W, Barrette R, Swenson S, Bracht A, Rowland J, Fabian A, Moran K, Mohamed F, O'Hearn E, Jenkins-Moore M, Toms D, Shaw J, Morales P, Pyburn D, Carrillo C, Mayr G, McIntosh M, Deng M (2013) Virus and antibody diagnostics for swine samples of the Dominican Republic collected in regions near the border to Haiti. *ISRN Virology* 2013:1-7. doi: 10.5402/2013/425831
- Yang S, Wang Y, Shen Q, Zhang W, Hua X (2013) Prevalence of porcine enterovirus 9 in pigs in middle and eastern China. *Virology Journal* 10:99. doi: <http://www.virologyj.com/content/10/1/99>

- Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D, Wurm R (2001) Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J Virol* 75:1620-1631. doi: 10.1128/jvi.75.4.1620-1631.2001
- Zell R, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Doherty M, Hoey E, Dauber M, Prager D, Wurm R (2000) Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I-III with specific primer sets. *J Virol Methods* 88:205-218. doi: 10.1016/S0166-0934(00)00189-0
- Zhang W, Yang S, Shen Q, Ren L, Shan T, Wei J, Cui L, Hua X (2012) Complete genome sequence of a novel porcine enterovirus strain in China. *J Virol* 86:7008-7009. doi: 10.1128/jvi.00711-12
- Zlotowski P, Corrêa AMR, Barcellos DESN, Cruz CEF, Asanome W, Barry AF, Alfieri AA, Driemeier D. (2008) Intestinal lesions in pigs affected with postweaning multisystemic wasting syndrome. *Braz J Vet Res* 28:313-318. doi: 10.1590/S0100-736X2008000600009

4 CONCLUSÕES

- A infecção pelo teschovirus A (TV-A), sapelovirus A (SV-A) e enterovirus G (EV-G) em leitões de maternidade não foi encontrado neste estudo;
- A transmissão horizontal pelo contato entre animais exerce um importante papel na epidemiologia das infecções pelos picornavírus entéricos suínos pela manutenção da circulação viral dentro dos rebanhos.
- Infecções por sapelovirus A (SV-A) não ocorreu em infecções singulares, somente em infecções mistas.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Table 1. Porcine enteric picornavirus detection by RT-PCR assay in paired fecal samples from suckling and nursery pigs

Pig identification	Age (weeks)	Fecal consistency	Porcine enteric picornaviruses		
			TV-A	SV-A	EV-G
1	2	Pasty	-	-	-
	6	Solid	+	+	+
17	2	Liquid	-	-	-
	6	Pasty	-	-	-
26	2	Solid	-	-	-
	6	Liquid	+	-	+*
42	2	Pasty	-	-	-
	6	Liquid	+	+	+
59	2	Liquid	-	-	-
	6	Pasty	+	+*	+
81	3	Solid	-	-	-
	5	Pasty	+*	+*	+*
87	3	Solid	-	-	-
	4	Pasty	-	-	+
106	2	Pasty	-	-	-
	5	Pasty	+	+*	+
112	2	Solid	-	-	-
	6	Pasty	-	-	-
125	2	Solid	-	-	-
	5	Solid	-	-	+
137	3	Solid	-	-	-
	6	Liquid	+	+	+
221	2	Solid	-	-	-
	6	Pasty	+	+	+
233	2	Solid	-	-	-
	5	Solid	-	-	-
235	2	Pasty	-	-	-
	6	Pasty	+	+	+
276	2	Solid	-	-	-
	5	Pasty	+	-	+
282	2	Pasty	-	-	-
	6	Pasty	+	+	+*
469	2	Pasty	-	-	-
	5	Pasty	+*	-	+
Total			12	9	14

* N-PCR amplicons submitted to sequencing analysis.

APÊNDICE B

Table 2. Percentage of similarity between 5'-non-translated nucleotide sequences in this study, previously reported Brazilian strains, and other porcine enteric picornavirus sequences available in GenBank.

Reference strains	GenBank accession numbers	Porcine enteric picornavirus strains in this study		
<i>Teschovirus A</i>				
		BRA/UEL-DT508/12	BRA/UEL-DT565/12	
BRA/UEL-DT508/12	*	-	97.4	
BRA/UEL-DT565/12	*	97.4	-	
BRA/UEL-WB01/13	Donin et al. 2015*	98	99.3	
BRA/UEL-3/13	Donin et al. 2014*	98.7	98.7	
BRA/UEL-1/11	Donin et al. 2014*	96.7	99.3	
PTV-1 Vir 2481/02	GQ293228	97.4	100	
PTV-2 Stendal 2532	AY392537	97.4	98.7	
PTV-3 1-AA-VI	AY392540	97.4	100	
PTV-4 PS 36	AF296089	97.4	100	
PTV-5 Sek 254/97	GQ293234	96.7	98	
PTV-6 Vir 3634/85	AF296115	97.4	98.7	
PTV-7 F 43	AF296092	98	99.3	
PTV-8 25-T-VII	AF296118	96.7	98	
PTV-9 Vir 2899/84	AF296094	96.7	98	
PTV-10 UKG/170/80	AY392539	97.4	100	
PTV-11 Dresden	AF296096	96.7	98	
<i>Sapelovirus A</i>				
		BRA/UEL-DS417/12	BRA/UEL-DS508/12	BRA/UEL-DS509/12
BRA/UEL-DS417/12	KR139669	-	100	100
BRA/UEL-DS508/12	KR139670	100	-	100
BRA/UEL-DS509/12	KR139671	100	100	-
BRA/UEL-WB20/13	KJ187770	96.6	96.6	96.6
BRA/UEL-3/13	KF410644	98.5	98.5	98.5
BRA/UEL-2/13	KF410643	98.5	98.5	98.5
PEV-8 16-S-X	AY392543	97.1	97.1	97.1
PEV-8 26-T-XII	AY392544	97.1	97.1	97.1
PEV-8 Sek 1562/98	AY392556	96.1	96.1	96.1
PEV-8 38-V-II	AY392545	99	99	99
PSV-8 V13	AF406813	98	98	98
PSV CSH	HQ875059	97.1	97.1	97.1
PSV YC2011	JX286666	98.5	98.5	98.5
KS05151	KJ821020	99	99	99
KS04105	KJ821019	98.5	98.5	98.5
<i>Enterovirus G</i>				
		BRA/UEL-DE418/12	BRA/UEL-DE508/12	BRA/UEL-DE605/12
BRA/UEL-DE418/12	KR139672	-	100	99.6
BRA/UEL-DE508/12	KR139673	100	-	99.6
BRA/UEL-DE605/12	KR139674	99.6	99.6	-
BRA/UEL-WB40/13	KJ187771	98.7	98.7	98.3
BRA/UEL-4/13	KF410646	99.3	99.3	99
BRA/UEL-3/13	KF410645	99.6	99.6	99.3
WBD/2011/HUN	JN807387	98.3	98.3	98.7
CH/HLJMDJ/2012	KF008199	98.3	98.3	98
UKG/216/80	AF363454	99	99	98.7
PEV-9 112	GU262994	99.3	99.3	99
LP 54	AF363455	88.4	88.4	88.4
UKG/410/73	AF363453	89.3	89.1	89.1

* Sequences shorter than 200 bp and, therefore, not submitted to GenBank. The TV-A nucleotide sequences are available with the corresponding author in these studies.

APÊNDICE C

Table 3. TV-A nucleotide sequences described in this study.

Samples	Nucleotide sequences
BRA/UEL-DT508/12	GAAAGACCTGCTCTGGCGCGAGCTAGAGCGCAATTGTCACCAG GTATTGTACCAATGGTGGCGACAGGGTACAGAAGAGCAAGTAC TCCTGACTGGGCAATGGGACTGCATTGCATATCCCTAGGCATCT ATTGAGATTTCTCTGGGGCCCACCAGCA
BRA/UEL-DT565/12	GAAAGACCTGCTCTGGCGCGAGCTAAAGCGCAATTGTCACCAG GTATTGCACCAATGGTGGCGACAGGGTACAGAAGAGCAAGTA CTCCTGACTGGGTAATGGGACTGCATTGCATATCCCTAGGCAC CTATTGAGATTTCTCTGGGGCCCACCAGCA

ANEXOS

ANEXO A

Lista de Reagentes

1. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
2. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
3. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83 (Sicalab[®])
4. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
5. Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico – EDTA, P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}_2\text{2H}_2\text{O}$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
6. Agarose (*Invitrogen[™] Life Technologies*)
7. UltraPure[™] DEPC-Treated Water (Dietilpirocarbonato) (*Invitrogen[™] Life Technologies*)
8. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
9. Álcool isoamílico ($(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) P.M. 88,15 (*Synth[®]*)
10. Azul de bromofenol (Sigma[®])
11. Bicarbonato de sódio P.A. (NaHCO_3) P.M. 84,01 (Biotec[®])
12. Borohidreto de sódio P.M. 37,83 (Sigma[®])
13. Brometo de etídeo ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
14. Cloreto de cálcio puro (CaCl_2) P.M. 110,94 (*Invitrogen[™] Life Technologies*)
15. Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (*Invitrogen[™] Life Technologies*)
16. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
17. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
18. Clorofórmio, P.A. (CHCl_3) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
19. Dimetilsulfóxido (DMSO) $\text{C}_2\text{H}_6\text{SO}$ (Sigma[®])
20. Dióxido de sílica (SiO_2) P.M. 60,08 (Sigma[®])
21. Dithiothreitol (DTT-10 mM) (*Invitrogen[™] Life Technologies*)
22. DNA Ladder (123 bp) (*Invitrogen[™] Life Technologies*)
23. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μL ; 25 μmol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (*Invitrogen[™] Life Technologies*)
24. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$) P.M. 288,38 (*Synth[®]*)
25. Fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) P.M. 94,11 (*Invitrogen[™] Life Technologies*)
26. Fosfato de sódio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 177,99 (*Merck[®]*)
27. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen[®])

28. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (*Synth*[®])
29. Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) P.M. 180,16 (*Reagen*[®])
30. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (*Dinâmica*[®])
31. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (*Inlab*[®])
32. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (*Gibco BRL*[®])
33. Metanol P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (*Allkimia*[®])
34. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) PCR
- Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* PEV1a (*forward*; 5' - AGT TTT GGA TTA TCT TGT GCC C - 3'; *nucleotide* (nt) 76-97 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (*IDT- Integrated Device Technology*[®]))
 - Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* PEV1e (*reverse*; 3' - CGC GAC CCT GTC AGG CAG CAC - 5'; *nucleotide* (nt) 391-371 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (*IDT- Integrated Device Technology*[®]))
 - Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* PEV8e (*forward*; 5' - CTT AAG GTG GTT GTA TCC CCT AC - 3'; *nucleotide* (nt) 23-45 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (*IDT- Integrated Device Technology*[®]))
 - Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* PEV8f (*reverse*; 3' - TTC AAC TGA CTA TAC TAG TTA CAG G - 5'; *nucleotide* (nt) 435-411 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (*IDT- Integrated Device Technology*[®]))
 - Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* PEV9a (*forward*; 5' - GTA CCT TTG TAC GCC TGT TTT A - 3'; *nucleotide* (nt) 96-117 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (*IDT- Integrated Device Technology*[®]))
 - Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* PEV9b (*reverse*; 3' - ACC CAA AGT AGT CGG TTC CGC - 5'; *nucleotide* (nt) 586-566 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (*IDT- Integrated Device Technology*[®]))
35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *nested-PCR*
- Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* PEV1c (*forward*; 5' - TGA AAG ACC TGC TCT GGC GCG AG - 3'; *nucleotide* (nt) 178-200 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (*IDT- Integrated Device Technology*[®]))
 - Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* PEV1d (*reverse*; 3' - GCT GGT GGG CCC CAG AGA AAT CTC - 5'; *nucleotide* (nt) 335-312 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (*IDT- Integrated Device Technology*[®]))

- c. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* PEV8g (*forward*; 5' - ATG GCA GTA GCG TGG CGA GCT AT - 3'; *nucleotide* (nt) 131-153 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (IDT- *Integrated Device Technology*[®])
 - d. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* PEV8h (*reverse*; 3' - GTA ATG CCA AGA GCA TGC GCC A - 5'; *nucleotide* (nt) 342-321 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (IDT- *Integrated Device Technology*[®])
 - e. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *forward* PEV9c (*forward*; 5' - CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG - 3'; *nucleotide* (nt) 197-217 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (IDT- *Integrated Device Technology*[®])
 - f. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) *reverse* PEV9e (*reverse*; 3' - GTT AGG ATT AGC CGC ATT CAG GGG - 5'; *nucleotide* (nt) 509-486 Krumbholz et al. (2003) - 200 pmol (IDT- *Integrated Device Technology*[®])
36. PCR-*buffer* (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (*Invitrogen*[™] *Life Technologies*)
37. *Platinum Taq DNA Polymerase* 500 units (*Invitrogen Life Technologies*[™])
38. *Quant-iT*[™] *dsDNA BR assay kit* (*Invitrogen Life Technologies*[™])
39. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen[®])
40. Triton x-100 (J.T.Baker[®])

ANEXO B

Soluções e Tampões

- **Diluição dos primers**

PCR para detecção da região 5'NTR do genoma do *Teschovirus A*

- *Primer forward TV-A PCR-PEV1a*

Sequência: 5'- AGT TTT GGA TTA TCT TGT GCC C - 3'

Posição: 76-97

Concentração: 30,6 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$30,6 \times 1000 = 30600 \text{ pmoles}$$

$$30600 / 200 = 153 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

Solução estoque (*Primer* mãe 200 pmol/ μ L): ressuspender em água ultrapura para obtenção de solução 10x []

Solução de uso de todos os *primer*: diluir 1:10 a solução estoque em água ultrapura.

Concentração final: 20 pmol/ μ L

- *Primer reverse TV-A PCR-PEV1e*

Sequência: 3'- CGC GAC CCT GTC AGG CAG CAC – 5'

Posição: 391-371

Concentração: 29,7 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$29,7 \times 1000 = 29700 \text{ pmoles}$$

$$29700 / 200 = 148,5 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

Nested-PCR para detecção da região 5'NTR do genoma do *Teschovirus A*

- *Primer forward TV-A n-PCR-PEV1c*

Sequência: 5' - TGA AAG ACC TGC TCT GGC GCG AG - 3'

Posição: 178-200

Concentração: 24,8 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$24,8 \times 1000 = 24800 \text{ pmoles}$$

$$24800 / 200 = 124 \mu\text{L de água ultrapura}$$

- *Primer reverse TV-A n-PCR-PEV1d*

Sequência: 3' - GCT GGT GGG CCC CAG AGA AAT CTC - 5'

Posição: 335-312

Concentração: 32,8 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$32,8 \times 1000 = 32800 \text{ pmoles}$$

$$32800 / 200 = 164 \mu\text{L de água ultrapura}$$

PCR para detecção da região 5'NTR do genoma do *Sapelovirus A*

- *Primer forward SV-A PCR-PEV8e*

Sequência: 5' - CTT AAG GTG GTT GTA TCC CCT AC - 3'

Posição: 23-55

Concentração: 30,7 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$30,7 \times 1000 = 30700 \text{ pmoles}$$

$$30700 / 200 = 153,5 \mu\text{L de água ultrapura}$$

- *Primer reverse SV-A PCR-PEV8f*

Sequência: 3' - TTC AAC TGA CTA TAC TAG TTA CAG G - 5'

Posição: 435-411

Concentração: 32,9 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$32,9 \times 1000 = 32900 \text{ pmoles}$$

$$2900 / 200 = 164,5 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapura}$$

Nested-PCR para detecção da região 5'NTR do genoma do *Sapelovirus A*

- *Primer forward SV-A n-PCR-PEV8g*

Sequência: 5' - ATG GCA GTA GCG TGG CGA GCT AT - 3'

Posição: 131-153

Concentração: 39,7 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$39,7 \times 1000 = 39700 \text{ pmoles}$$

$$39700 / 200 = 198,5 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapura}$$

- *Primer reverse SV-A n-PCR-PEV8h*

Sequência: 3' - GTA ATG CCA AGA GCA TGC GCC A - 5'

Posição: 342-321

Concentração: 28,1 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$28,1 \times 1000 = 28100 \text{ pmoles}$$

$$28100 / 200 = 140,5 \text{ } \mu\text{L de } \text{águas ultrapura}$$

PCR para detecção da região 5'NTR do genoma do *Enterovirus G*

- *Primer forward EV-G PCR-PEV9a*

Sequência: 5' - GTA CCT TTG TAC GCC TGT TTT A - 3'

Posição: 96-117

Concentração: 37,1 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$37,1 \times 1000 = 37100 \text{ pmoles}$$

$$37100 / 200 = 185,5 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

- *Primer reverse EV-G PCR-PEV9b*

Sequência: 3' - ACC CAA AGT AGT CGG TTC CGC - 5'

Posição: 586-566

Concentração: 40,5 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$40,5 \times 1000 = 40500 \text{ pmoles}$$

$$40500 / 200 = 202,5 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

Nested-PCR para detecção da região 5'NTR do genoma do Enterovirus G

- *Primer forward EV-G n-PCR-PEV9c*

Sequência: 5' - CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG - 3'

Posição: 197-217

Concentração: 28,6 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$28,6 \times 1000 = 28600 \text{ pmoles}$$

$$28600 / 200 = 143 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

- *Primer reverse EV-G n-PCR-PEV9e*

Sequência: 3' - GTA ATG CCA AGA GCA TGC GCC A - 5'

Posição: 509-486

Concentração: 32,1 nmoles

Data de fabricação: Jun / 2011

$$32,1 \times 1000 = 32100 \text{ pmoles}$$

$$32100 / 200 = 160,5 \text{ } \mu\text{L de } \text{água ultrapura}$$

- **Diluição de dNTP**
 - solução estoque (100 mM) – 100 µL de cada dNTP
 - solução uso (10 mM) – 10 µL da solução estoque + 90 µL de água ultrapura
- **Fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1)**
 - 25 mL fenol saturado
 - 24 mL clorofórmio
 - 1 mL álcool isoamílico
- **Gel de agarose 1%**
 - 0,5 g agarose
 - 50 mL de tampão TBE 1x
 - 20 µL de brometo de etídeo
- **Hidratação da sílica**
 - 6 g de sílica (O₂Si) (SIGMA[®])
 - Adicionar 500 mL de água bidestilada
 - Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
 - Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
 - Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
 - Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
 - Desprezar 440 mL do sobrenadante
 - Ajustar o pH (pH 2,0) com HCl fumegante
 - Aliquotar
- **SDS 10%**
 - 5 g dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
 - água bidestilada q.s.p. 50 mL
- **Solução L6**
 - 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
 - 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
 - 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0

- 2,6 mL de Triton x100

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

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

- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**
 - Tris 0,89 M
 - Ácido bórico 0,89 M
 - EDTA 0,02 M
 - água bidestilada q.s.p. 1 litro
 - ajustar o pH (pH 8,4)

- **Tampão Fosfato Salina – PBS**
 - 137 mM Cloreto de sódio (NaCl)
 - 3 mM Cloreto de potássio (KCl)
 - 8 mM Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4)
 - 15 mM Potássio fosfato monobásico (KH_2PO_4)
 - Água ultrapura autoclavada q.s.p. 500 mL

ANEXO C

Protocolos de Técnicas

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

1. *Suspensão fecal – extração bruta*

- 100 μ L ou 100 mg de fezes
- 500 μ L de PBS
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar a 5000 x g / 3 min
- Utilizar 500 μ L do sobrenadante para extração

2. *Extração do ácido nucleico*

Fase I – Fenol

- 500 μ L da suspensão fecal
- Adicionar 50 μ L de SDS 10%
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56 °C /20 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 500 μ L de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56 °C /15 min
- Homogeneizar manualmente por 15 s
- Centrifugar 10.000 x g /10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo

Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

- Adicionar 500 μ L da solução L6
- Adicionar 25 μ L de sílica hidratada
- Homogeneizar em *vortex*

- Agitar em temperatura ambiente /30 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 500 µL de solução L2
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
- Adicionar 1000 µL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 µL de etanol 70% gelado
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante em descarte comum
- Adicionar 1000 µL de acetona P.A. gelada
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria a 56°C (15 min)
- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56°C/15 min
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 13.000 x g /4 min
- Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 µL
- Estocar -20°C até a utilização

- **Reação em cadeia pela polimerase (PCR)**

- *Mix* desnaturação do genoma do TV-A, SV-A e EV-G

Reagentes	Volume (µL)
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ <i>Primer</i>	1
dNTP (2,5 mM)	1
Água	6
Ácido nucleico	5
Volume final	13

Essa reação foi submetida a uma temperatura de 65°C por 15 minutos seguida do banho de gelo por 5 minutos.

- *Mix* RT do genoma do TV-A, SV-A e EV-G

Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer</i> 5 x [Tris-HCl 250 mM (pH 8,3); KCl 375 mM; MgCl ₂ 15 mM]	4
DTT (0,1 mM)	2
M-MLV (200 U/µL)	1
Volume final	7

Nesta etapa a reação foi submetida a uma temperatura de 37°C por 50 minutos, seguido da inativação a 70°C por 15 minutos.

- *Mix* de PCR para detecção parcial da região 5'NTR genoma do TV-A

Reagentes	Volume (µL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinun</i> ®Taq DNA Polymerase (5 U/µL)	0,4
<i>Primer Forward</i> PEV-1a (20 pmol/µL)	0,5
<i>Primer Reverse</i> PEV-1e (20 pmol/µL)	0,5
Água	39,1

Volume final	48
--------------	----

- Mix da *nested*-PCR para detecção parcial da região 5'NTR genoma do TV-A

Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinun</i> [®] <i>Taq DNA Polymerase</i> (5 U/ μL)	0,4
<i>Primer Forward</i> PEV-1c (20 pmol/ μL)	0,5
<i>Primer Reverse</i> PEV-1d (20 pmol/ μL)	0,5
Água	39,1
Volume final	48

- Mix de PCR para detecção parcial da região 5'NTR genoma do SV-A

Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinun</i> [®] <i>Taq DNA Polymerase</i> (5 U/ μL)	0,4
<i>Primer Forward</i> PEV-8e (20 pmol/ μL)	0,5
<i>Primer Reverse</i> PEV-8f (20 pmol/ μL)	0,5
Água	39,1
Volume final	48

- Mix da *nested*-PCR para detecção parcial da região 5'NTR genoma do SV-A

Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂	1,5
dNTP (2,5 mM)	1

<i>Platinun[®]Taq DNA Polymerase</i> (5 U/ μ L)	0,4
<i>Primer Forward</i> PEV-8g (20 pmol/ μ L)	0,5
<i>Primer Reverse</i> PEV-8h (20 pmol/ μ L)	0,5
Água	39,1
Volume final	48

- Mix de PCR para detecção parcial da região 5'NTR genoma do EV-G

Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinun[®]Taq DNA Polymerase</i> (5 U/ μ L)	0,4
<i>Primer Forward</i> PEV-9a (20 pmol/ μ L)	0,5
<i>Primer Reverse</i> PEV-9b (20 pmol/ μ L)	0,5
Água	39,1
Volume final	48

- Mix da *nested*-PCR para detecção parcial da região 5'NTR genoma do EV-G

Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5
MgCl ₂	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
<i>Platinun[®]Taq DNA Polymerase</i> (5 U/ μ L)	0,4
<i>Primer Forward</i> PEV-9c (20 pmol/ μ L)	0,5
<i>Primer Reverse</i> PEV-9e (20 pmol/ μ L)	0,5
Água	39,1
Volume final	48

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR para os três vírus.

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de Ciclos
Desnaturação	94	5	1
Desnaturação	94	1	40
Anelamento	55	1	40
Extensão	72	1	40
Extensão final	72	5	1

- Ciclos de tempo e temperatura da *nested*-PCR para os três vírus.

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Nº de Ciclos
Desnaturação	94	5	1
Desnaturação	94	1	35
Anelamento	55	1	35
Extensão	72	1	35
Extensão final	72	5	1

- **Eletroforese em gel de agarose a 2%**

- 1 g de agarose

- 50 mL TEB *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM) pH 8,4

- 20 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

São utilizados 5 µL do *amplicon* e 1 µL do tampão de amostra. A eletroforese sob voltagem (100V) e amperagem (80A) constantes ocorre em aproximadamente 50 min.

- **Purificação de produto de PCR excisado do gel**

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL.
2. Adicionar 3 µL do *Gel Solubilization* (L3) para cada 1 mg de gel.
3. Incubar o microtubo a 50°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min.
4. Centrifugar a 12.000 x g / 30s.
5. Transferir amostra solubilizada para um tubo coletor com coluna.
6. Centrifugar a 12.000 x g / 1min.

7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
8. Adicionar 500 μL do *Wash buffer* (W1) na coluna com tubo coletor
9. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1min.
10. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo.
11. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1-2min.
12. Descartar o filtrado e recolocar a coluna para um microtubo de 1,5 mL.
13. Adicionar 30 μL do *Elution buffer* (E5)
14. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.
15. Centrifugar a 12.000 x *g* / 1 min.
16. Estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C .

- **Quantificação de produto de PCR**

(Certificar-se de que todos os reagentes estão em temperatura ambiente)

1. Preparar a solução Quant-iT™ *Working Solution* diluindo o reagente Quant-iT™ em *Buffer* Quant-iT™ 1:200. São necessários 200 μL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
2. Homogeneizar em *vortex*.
3. No microtubo das amostras adicionar 198 μL da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 2 μL do fragmento de DNA purificado.
4. No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μL da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 10 μL do padrão 0.
5. No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μL da solução Quant-iT™ *Working Solution* a 10 μL do padrão 100.
6. Homogeneizar os microtubos em *vortex* por 2-3 s
7. Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
8. Realizar a leitura usando Qubit™ fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, EUA)
9. Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

ANEXO D

Lista de Softwares

- Electropherogram quality analysis - Phred e CAP3
(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)
- BLAST - The Basic Local Alignment Search Tool
(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- MEGA 6 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0
(<http://www.megasoftware.net/mega.php>)
- BioEdit software version 7.1.11
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)