



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANE RIBEIRO

**DETECÇÃO DE RNA DE KOBUVÍRUS ENTÉRICO BOVINO
(*AICHIVIRUS B*) E SUÍNO (*AICHIVIRUS C*) EM REBANHOS
BRASILEIROS**

Londrina
2013

JULIANE RIBEIRO

**DETECÇÃO DE RNA DE KOBUVÍRUS ENTÉRICO BOVINO
(*AICHIVIRUS B*) E SUÍNO (*AICHIVIRUS C*) EM REBANHOS
BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal)

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R484d Ribeiro, Juliane.
Detecção de RNA de kobuvírus entérico bovino (Aichivirus B) e suíno (Aichivirus C) em rebanhos brasileiros / Juliane Ribeiro. - Londrina, 2013.
60 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Viroses em animais - Brasil - Teses. 2. Diarréia em bovino - Teses. 3. Bovino – Viroses - Teses. 4. Suíno - Viroses - 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(81)

JULIANE RIBEIRO

**DETECÇÃO DE RNA DE KOBUVÍRUS ENTÉRICO BOVINO
(*AICHIVIRUS B*) E SUÍNO (*AICHIVIRUS C*) EM REBANHOS
BRASILEIROS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação, em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal)

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marlise Pompeo Claus
IFC – Araquari – SC

Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
UNOPAR – Londrina – PR

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
UEL – Londrina – PR

Londrina, 05 de julho de 2013.

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 para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Sanidade Animal), sob 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, pela graça em conquistar mais esse desafio.

Ao professor Amauri Alfieri, por aceitar me orientar. Pela oportunidade e paciência. Estendendo meu agradecimento a toda família Alfieri desde o meu período da residência médica. Obrigada pela confiança em me receber ao Laboratório de Virologia Animal.

À professora Alice Fernandes Alfieri, pelos bons conselhos, carinho e aprendizado.

A todos da minha família. Obrigada pelo apoio e por acreditar nesse sonho junto comigo.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por contribuírem em minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao pessoal da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG).

A todos os funcionários. Principalmente à secretária da pós-graduação Helenice, sempre muito solícita e paciente. Também às “tias” da cozinha (Maria e Neuza) pela amizade e o cafezinho.

À técnica do Laboratório de Virologia, Dalíria do Prado (*in memoriam*) por seus ensinamentos no laboratório e seu exemplo de vida. Nunca me esquecerei de seus conselhos, risadas, histórias, almoços engraçados e de sua companhia. Saudade.

À grande amiga Kerlei Cristina Médice, sempre muito paciente, atenciosa e generosa. Obrigada pelos ensinamentos e amizade.

A todos os companheiros do Laboratório de Virologia Animal. Muito obrigada pela companhia, parceria e por dividirem comigo os momentos bons e também os frustrantes da pesquisa.

Em especial, quero agradecer à Aline Barry por me “adotar” em sua pesquisa. Obrigada por sua paciência e confiança.

Agradeço aos meus fiéis amigos, Elis Lorenzetti, ao Wagner Borges e a Thaís Neris Medeiros. O apoio de vocês foi muito importante durante essa caminhada.

Muito obrigada.

*“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica:
a VONTADE”*

Albert Einstein

RIBEIRO, J. **Detecção de RNA de kobuvírus entérico bovino (*Aichivirus B*) e suíno (*Aichivirus C*) em rebanhos brasileiros**. 2013. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

O gênero *Kobuvirus* pertence à família *Picornaviridae* e, de acordo com a espécie hospedeira, foi recentemente subdividido em três espécies denominadas *Aichivirus A*, *B* e *C* que infectam seres humanos, bovinos e suínos, respectivamente. No Brasil não há relatos da infecção por *Aichivirus B* em bovinos e apenas um relato de *Aichivirus C* em suínos e, com isso, o objetivo desse estudo foi avaliar parâmetros da infecção nessas espécies de animais de produção. No primeiro estudo foi avaliada a presença do *Aichivirus B* em 222 amostras fecais diarreicas de bovinos coletadas no período de 2010-2012. A amostragem incluiu amostras fecais de bovinos provenientes de 36 rebanhos de quatro regiões geográficas brasileiras (Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte). Para avaliar a frequência de ocorrência do *Aichivirus B* em diferentes tipos de produção foram avaliadas amostras fecais de rebanhos bovinos de corte ($n=105$) e leite ($n=117$). Para determinar a categoria animal mais susceptível à infecção, a amostragem incluiu amostras fecais diarreicas de bezerros ($n=182$) e de animais adultos ($n=40$). Um fragmento de 219 pb do gene RdRp de kobuvírus foi amplificado por RT-PCR em 18,2% (40/222) das amostras fecais diarreicas avaliadas. Foram encontrados animais positivos em rebanhos de todas as regiões geográficas incluídas no estudo indicando a ampla distribuição desse vírus nos rebanhos bovinos brasileiros. A maior ($P \leq 0,05$) taxa de infecção (20,9%; 38/182) por *Aichivirus B* foi encontrada em animais jovens, enquanto que em bovinos adultos o RNA viral foi detectado em 5% (2/40) das amostras avaliadas. A análise da sequência de nucleotídeos de três amplicons demonstrou que as cepas de *Aichivirus B* identificadas nesse estudo agruparam em um ramo distinto na árvore filogenética. Esse estudo demonstrou a ampla distribuição das infecções por kobuvírus em rebanhos bovinos e que os animais jovens são mais susceptíveis à infecção. No segundo estudo foi avaliada a frequência de infecção do *Aichivirus C* nas três principais regiões produtoras de suínos no Brasil. Foram avaliadas 63 amostras fecais de leitões lactentes (1 a 3 semanas de idade) colhidas no período de 2004 a 2011 em 46 rebanhos suínos localizados nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil. A presença de RNA de *Aichivirus C* nas amostras foi avaliada por meio da técnica de RT-PCR. Um fragmento de 219 pb do gene RdRp foi amplificado em 48 (76,2%) amostras fecais provenientes de todas as regiões geográficas incluídas no estudo demonstrando a ampla distribuição da infecção. As taxas de detecção do *Aichivirus C* foram maiores ($P < 0,05$) em leitões com duas e três semanas de idade do que na primeira semana de vida. A análise da sequência de nucleotídeos (nt) de três amplicons possibilitou agrupar as sequências desse estudo juntamente com as sequências de outras cepas previamente descritas no Brasil, revelando que não houve diferença filogenética nas cepas de *Aichivirus C* identificadas em diferentes regiões e idades.

Palavras-chave: Leitões. Bezerros. Diarreia. Picornavirus. Fezes. RT-PCR.

RIBEIRO, J. **Detection of enteric bovine (*Aichivirus B*) and porcine (*Aichivirus C*) kobuvirus RNA in Brazilian herds.** 2013. 60 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

The *Kobuvirus* genus is a member of the *Picornaviridae* family and according to the host species, has recently been subdivided into three species *Aichivirus A*, *B*, and *C* that infect humans, cattle, and pigs, respectively. In Brazil, there are no reports of *Aichivirus B* infection in cattle, with only one description of *Aichivirus C* in pigs. The aim of this study was to evaluate parameters of infection in these species of production animals. The first study evaluate the presence of *Aichivirus B* in 222 diarrheic fecal samples of cattle collected in 2010-2012. Fecal samples were obtained from cattle derived from 36 herds within four geographical regions (South, Southeast, Midwest, and North) of Brazil. The frequency of the occurrence of *Aichivirus B* in different types of cattle production was determined by analyzing fecal samples from beef ($n=105$) and dairy ($n=117$) herds. All samples were divided into two age-related categories: calves ($n=182$) and adult animals ($n=40$). A fragment of 219 bp of the RdRp gene was amplified by RT-PCR in 18.2% (40/222) of the fecal diarrheic samples evaluated. Positive animals occurred in herds from all geographic regions evaluated during this study, suggesting the wide distribution of this virus in Brazilian cattle herds. A more significant elevated ($P \leq 0.05$) infection rate (20.9%, 38/182) of *Aichivirus B* was found in young animals; viral RNA was detected in only 5% (2/40) of the adult bovine samples evaluated. The nucleotide (nt) sequence analysis showed that three amplicons of the *Aichivirus B* strains identified in this study clustered in a separate branch. This study demonstrated the wide distribution of *Aichivirus B* infections in Brazilian cattle herds and suggested that younger animals are more susceptible to infection. The second study evaluate the frequency of infection by *Aichivirus C* in three most important pig production regions of Brazil. The study included 63 fecal samples from suckling piglets (1-3 weeks old) collected during 2004-2011 from 46 pig herds located in the South, Southeast, and Center-West regions of Brazil. The presence of RNA *Aichivirus C* in the collected samples was determined by RT-PCR assay. A fragment of the 219 bp of the RdRp gene was amplified in 48 (76.2%) of the fecal samples from all geographic regions, demonstrating the diverse distribution of infection within Brazil. The detection rates of *Aichivirus C* was more significantly elevated ($P < 0.05$) in 2-3 week-old piglets when compared to those that were week old. The nt sequence analysis of three amplicons derived from this study demonstrated that these sequences clustered with other previously described strains from Brazil, suggesting that there was no phylogenetic difference in the *Aichivirus C* strains identified within piglets of different geographical regions and age groups.

Keywords: Piglets. Calves. Diarrhea. Picornaviruses. Feces. RT-PCR

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Modelo estrutural do kobuvírus. A: diagrama esquemático da estrutura do vírion. B: estrutura genômica do kobuvírus, organização dos genes codificantes de proteínas estruturais (P1) e não-estruturais (P2 e P3) 16
- Figura 2** – Reconstrução filogenética utilizando o método neighbor-joining, baseada em sequências de 141 nucleotídeos do gene 3D da polimerase 17

KOBUVIRUS (*AICHIVIRUS B*) INFECTION IN BRAZILIAN CATTLE HERDS

- Figure 1** – Phylogenetic analysis of partial nucleotide sequence (nt 203) of the RdRp gene of *Kobuvirus* 36

HIGH FREQUENCY OF *AICHIVIRUS C* (PORCINE KOBUVIRUS) INFECTION IN PIGLETS FROM DIFFERENT GEOGRAPHIC REGIONS OF BRAZIL

- Figure 1** – Neighbor-joining phylogenetic tree (Tamura-Nei model) constructed based on 170 nt partial *Aichivirus C* RdRp 41

LISTA DE TABELAS

KOBUVIRUS (*AICHIVIRUS B*) INFECTION IN BRAZILIAN CATTLE HERDS

Table 1 – Diarrheic fecal samples from Brazilian cattle herds evaluated by RT-PCR assay for kobuvirus detection.....	35
Table 2 – Positive diarrheic fecal samples of beef and dairy cattle for <i>Aichivirus B</i> in the four Brazilian geographical regions	35
Table 3 – Detection of <i>Aichivirus B</i> by RT-PCR assay in diarrheic fecal samples of young and adult animals of Brazilian beef and dairy cattle herds	35

HIGH FREQUENCY OF *AICHIVIRUS C* (PORCINE KOBUVIRUS) INFECTION IN PIGLETS FROM DIFFERENT GEOGRAPHIC REGIONS OF BRAZIL

Table 1 – Detection of <i>Aichivirus C</i> RNA by RT-PCR in faecal samples from suckling piglet belonging to pig herds located in seven different states in Brazil.....	40
Table 2 – Frequency of <i>Aichivirus C</i> detection by RT-PCR according to the age of the Piglets.....	40

SUMARIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	12
1.1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 AICHIVÍRUS A (AICHIVIRUS A)	17
1.3 AICHIVÍRUS B (AICHIVIRUS B)	19
1.4 AICHIVÍRUS C (AICHIVIRUS C)	21
1.5 REFERÊNCIAS	24
2 OBJETIVOS	28
2.1 OBJETIVO GERAL	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	29
3.1 ARTIGO 1: KOBUVIRUS (AICHIVIRUS B) INFECTION IN BRAZILIAN CATTLE HERDS	29
3.1.1 Abstract	29
3.1.2 Introduction	29
3.1.3 Materials and Methods	30
3.1.3.1 Inclusion criteria	30
3.1.3.2 RNA extraction.....	31
3.1.3.3 Kobuvirus detection.....	31
3.1.3.4 Sequencing and phylogenetic analysis	31
3.1.4 Results	32
3.1.5 Discussion	32
3.1.6 Acknowledgements	34
3.1.7 References	36
3.2 ARTIGO 2: HIGH FREQUENCY OF AICHIVIRUS C (PORCINE KOBUVIRUS) INFECTION IN PIGLETS FROM DIFFERENT GEOGRAPHIC REGIONS OF BRAZIL.....	38
3.2.1 Abstract	38
3.2.2 Introduction	38
3.2.3 Materials and Methods	39
3.2.3.1 Samples collection.....	39
3.2.3.2 Virus Detection.....	39
3.2.3.3 Statistical analysis.....	40

3.2.4 Results	40
3.2.5 Discussion	40
3.2.6 References	42
CONCLUSÕES	44
ANEXOS	45
ANEXO A – Detecção de Aichivírus B em amostras de fezes de bovinos pela técnica de RT-PCR	46
ANEXO B – Detecção de Aichivírus C em amostras de fezes de suínos pela técnica de RT-PCR	47
ANEXO C – Comparação de similaridade de nucleotídeos da região RdRp do Aichivirus B entre estirpes pertencentes ao Brasil com estirpes de outros países	48
APÊNDICE	49
APÊNDICE A – Lista de Reagentes	50
APÊNDICE B – Soluções e Tampões	52
APÊNDICE C – Protocolo de Técnicas	55
APÊNDICE D – Lista de Software	60

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A família *Picornaviridae* pertence à ordem *Picornavirales* e é composta por 17 gêneros que podem infectar humanos e várias espécies de animais em todo o mundo. Apenas oito gêneros (*Aphthovirus*, *Cardiovirus*, *Enterovirus*, *Kobuvirus*, *Hepatovirus*, *Sapelovirus*, *Teschovirus* e o *Tremovirus*) causam infecções em animais de produção (ICTV, 2013).

Os picornavírus determinam enfermidades de origem respiratória, hepática, cardíaca, neurológica, mucocutânea e doenças sistêmicas com diferentes níveis de gravidade. Em medicina veterinária existem doenças importantes que são causadas por membros desta família, destacando-se a Febre Aftosa que é considerada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) como a doença infecciosa animal de maior importância no mundo (HICKS; DUFFY, 2011; OIE, 2012).

Morfológicamente, os vírus da família *Picornaviridae* são esféricos, desprovidos de envelope lipoprotéico e apresentam 27 a 30 nm de diâmetro. O genoma é constituído por RNA fita simples (ssRNA) com polaridade positiva, poliadenilado na extremidade 3' e com 8,2-8,4 Kb de tamanho (OH et al., 2006; REUTER et al., 2011).

A organização viral típica dos picornavírus apresenta uma proteína genômica (Vpg) ligada covalentemente à extremidade 5'UTR com a função de regulação da síntese de RNA viral, uma proteína líder (L) responsável pela informação genética para a síntese de proteínas estruturais e não-estruturais, três proteínas estruturais de capsídeo (VP0, VP3 e VP1), sete proteínas não-estruturais (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D) e 3'UTR (REUTER et al., 2011) (Figura 1).

O gênero *Kobuvirus* foi recentemente reclassificado e dividido em três espécies, *Aichivirus A* que tem como espécie hospedeira os seres humanos; o *Aichivirus B* responsável por infecção em bovinos; e a terceira espécie do gênero o *Aichivirus C*, infectando suínos (ICTV, 2013). A representação das três espécies do gênero *Kobuvirus* e as suas disposições filogenéticas estão apresentadas na figura 2.

A palavra “*Kobu*” é de origem japonesa e significa botão, recebendo esse nome porque as partículas virais eram visualizadas em microscopia eletrônica como “botões acidentados” (YAMASHITA et al., 2000). As principais diferenças dos kobuvírus em relação aos outros picornavirus encontram-se na região de codificação da proteína L, na ausência de

um sítio de clivagem na região VP0 e uma forma distinta da proteína 2A (REUTER et al., 2011).

Os kobuvírus já foram descritos em animais domésticos e vários estudos relataram a sua presença em diversas espécies de animais em todo o mundo. A maioria dos relatos envolve a espécie suína e bovina (Anexo A e B, pag. 47 e 48). Porém, em outras espécies animais como ovino, caprino, canino, chiroptera (*Tadarida brasiliensis*) e javali (*Sus scrofa*) existem relatos da presença deste vírus (REUTER et al., 2010b; LI et al., 2010; LI et al., 2011; LEE et al., 2012; REUTER et al., 2013). Além destas espécies, possivelmente os animais silvestres também possam se infectar com o kobuvírus e, desta forma, atuarem como reservatórios do vírus na natureza (REUTER et al., 2011).

Até o momento, em nenhuma espécie os sinais clínicos estão confirmados pela presença da infecção do kobuvírus (DUFKOVA et al., 2013). Entretanto, assim como nos humanos, o sinal clínico de gastroenterite é o mais relacionado nos animais com a infecção (KHAMRIN et al., 2008; BARRY et al., 2011).

As taxas de diagnóstico do vírus entre animais aparentemente saudáveis (assintomáticos) com os que manifestam diarreia (sintomáticos) em alguns estudos são semelhantes (DI MARTINO et al., 2012; DUFKOVA et al., 2013; VERMA et al., 2013). Entretanto, os estudos de Park e colaboradores (2010) e Jeoung e colaboradores (2011) compararam amostras fecais de animais com e sem diarreia relatando taxas superiores nos animais com o sinal clínico de diarreia 87.5% e 37.2%, respectivamente, em comparação com os animais sem a manifestação de gastroenterite 19.3% e 23.8%, respectivamente.

A infecção é frequentemente relatada em animais jovens, até 6 meses de idade. A detecção dos kobuvírus em animais adultos é rara e apresentando uma menor taxa de infecção (BARRY et al., 2011). Um recente estudo realizado por Dufkova e colaboradores (2013) apresentou altas taxas de infecção 90.9% (30/33) em fezes de suínos adultos, a maior frequência encontrada em comparação com os resultados obtidos por Barry e colaboradores (2011) e Park e colaboradores (2010).

Segundo Verma e colaboradores (2013) a explicação para a detecção de kobuvírus tanto em animais com manifestação clínica quanto assintomáticos seria a existência de dois tipos virais distintos, sendo um patogênico e outro não patogênico. Outra explicação considerada é a carga viral, o que poderia refletir na manifestação dos sinais clínicos da infecção. A presença de outros vírus, como por exemplo, o rotavírus pode ser considerado um fator agravante na multiplicação ou que o kobuvírus seria um agente endógeno e que não

promoveria doença são propostas que explicariam a maneira como a infecção vem sendo encontrada (VERMA et al., 2013).

No entanto, até o momento, nenhuma dessas explicações é considerada definitiva. Com isso, novos estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre as cepas virais circulantes, sua manifestação no organismo e sobre as formas de transmissão do vírus.

O envolvimento do kobuvírus com outros patógenos entéricos foi avaliado em alguns estudos (KHAMRIN et al., 2009; JEOUNG et al., 2011; DUFKOVA et al., 2013). Diferentes vírus são apontados como importantes nas coinfeções com o kobuvírus. Destacando-se o rotavírus e o calicivírus (PARK et al., 2010; JEOUNG et al., 2011; VERMA et al., 2013).

A infecção interespecie pelo kobuvírus, até o momento, não foi descrita. Formas de contaminação pelas vias direta e indireta, por meio de água, alimentos ou fômites contaminados estão sendo investigadas como possibilidades de vias de transmissão. No caso dos humanos, segundo Reuter e colaboradores (2010), os kobuvírus são transmitidos, principalmente, pela via oral-fecal. Entretanto, por não estar totalmente esclarecido as formas de transmissão dos kobuvírus, o risco de transmissão zoonótica deve ser considerado (REUTER et al., 2011).

No Brasil, Barry e colaboradores (2011) detectaram uma cepa de kobuvírus de ovino que apresentou características filogenéticas semelhantes ao protótipo humano de *Aichivirus A*. No Japão, a estirpe H023/2009/JP, detectada em suínos, demonstrou maior semelhança com sequências de kobuvírus bovino, em relação às cepas suínas descritas (KHAMRIN et al., 2010).

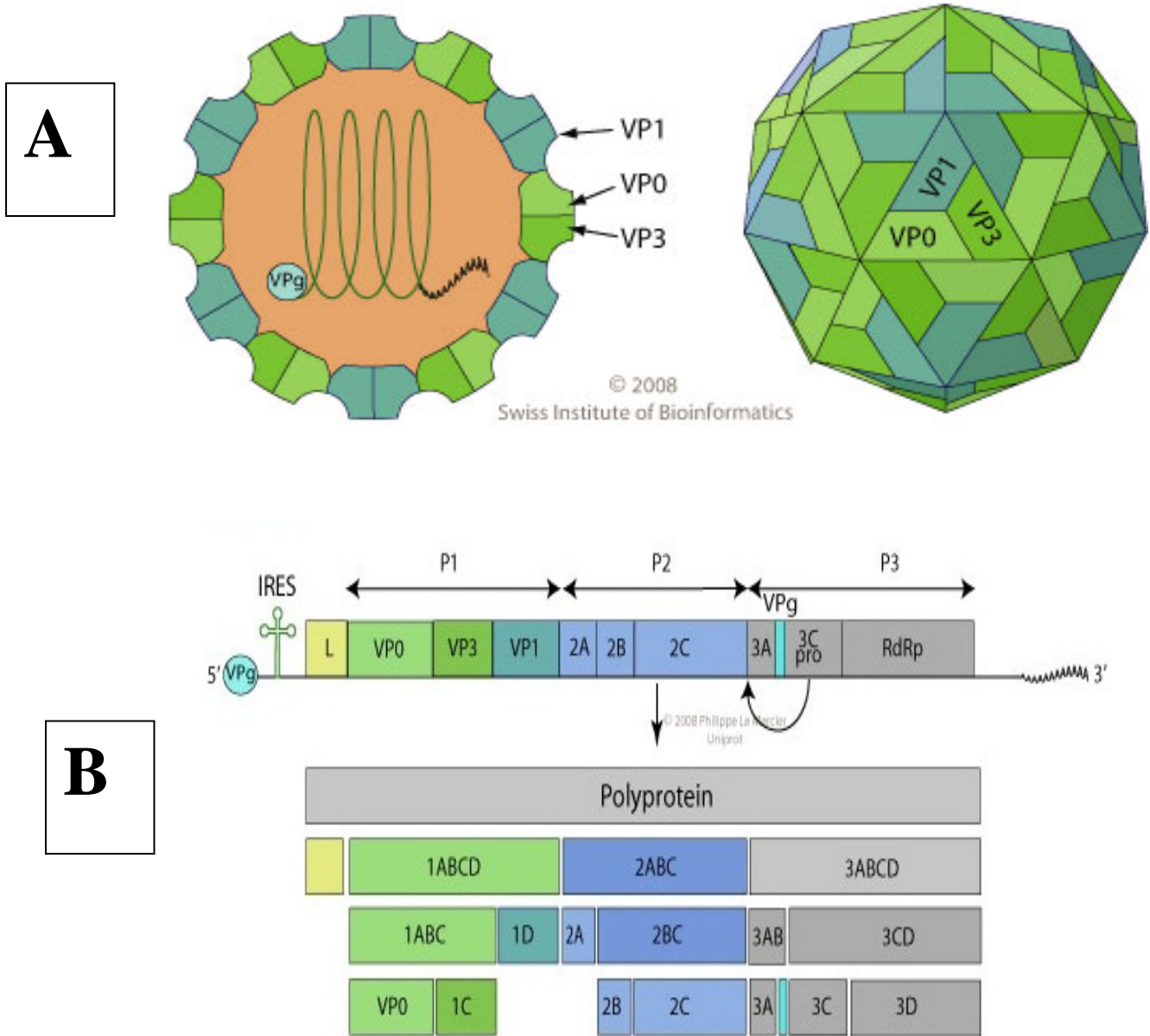
Reuter e colaboradores (2010b), descreveram kobuvírus em amostras fecais de ovinos assintomáticos. As sequências genômicas apresentam alta relação com cepas de aichivirus B, com 86% de nucleotídeos idênticos no segmento 3D do genoma viral. Este estudo apresenta a hipótese que cepas de aichivirus B possam causar infecção em ovinos.

A porção 3D do genoma viral do kobuvírus é considerada a região mais conservada e, por isso, é a região mais estudada e utilizada para a detecção deste vírus (REUTER; EGYED, 2009; KHAMRIN et al., 2010). Por outro lado, não é possível inferir com certeza a semelhança entre as cepas virais de kobuvírus circulantes ou a atuação de uma espécie de kobuvírus infectando outras espécies animais com base na análise filogenética dessa região do genoma (REUTER et al., 2011).

A região VP1 do gene do capsídeo viral é considerada a mais variável no genoma do kobuvírus. Com isso, estudos direcionados para essa região genômica estão sendo desenvolvidos com o objetivo de analisar as possibilidades de infecção interespecie (OKITSU et al., 2012).

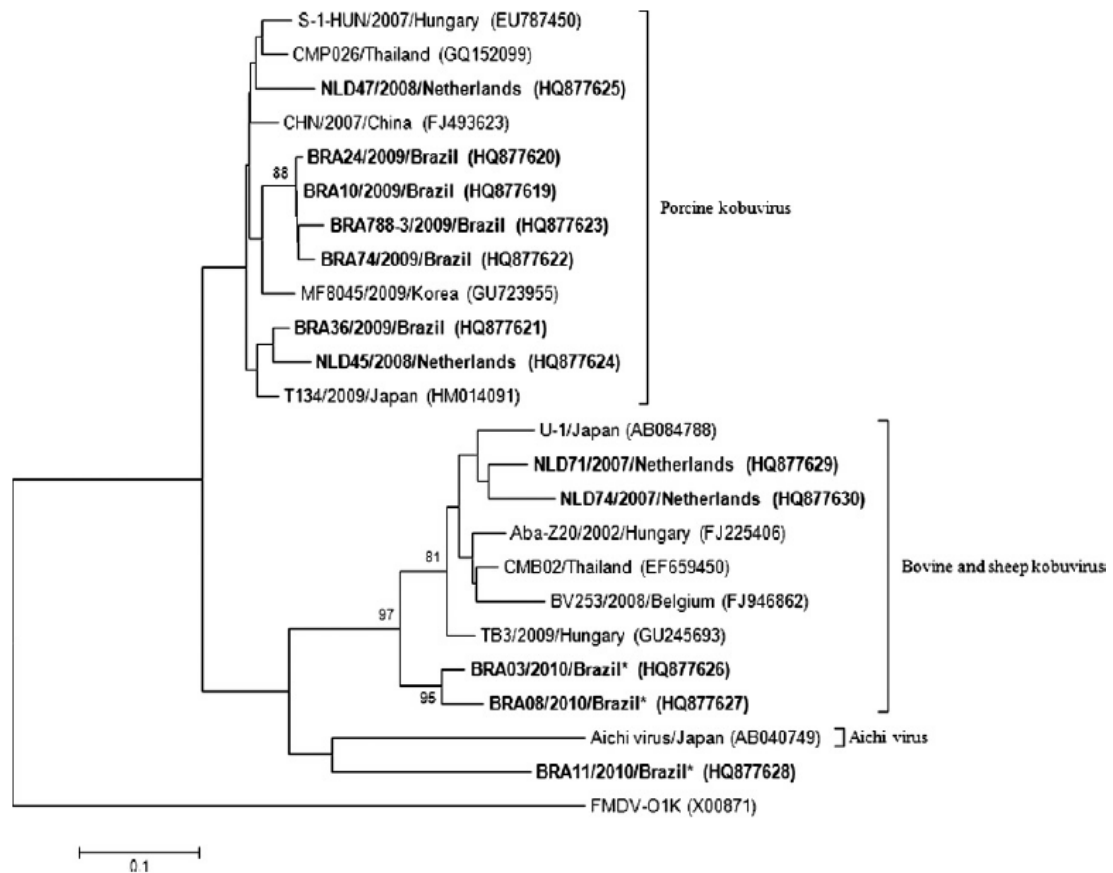
O gênero *Kobuvirus* foi identificado recentemente e, por isso, novos estudos com este vírus poderão auxiliar no esclarecimento da heterogeneidade genética e a sua distribuição global (DUFKOVA et al., 2013). A transmissão interespecie é um fator muito importante que deve ser investigado, já que a alta prevalência tanto de animais quanto de humanos positivos para este vírus pode representar risco para a saúde pública uma vez que a epidemiologia da infecção ainda não está esclarecida (KHAMRIN et al., 2010; DUFKOVA et al., 2013).

Figura 1 – Modelo estrutural do kobuvírus. **A:** diagrama esquemático da estrutura do vírion. **B:** estrutura genômica do kobuvírus, organização dos genes codificantes de proteínas estruturais (P1) e não-estruturais (P2 e P3).



Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/652.html. Acesso em 14 de janeiro de 2013.

Figura 2 – Reconstrução filogenética utilizando o método neighbor-joining, baseada em seqüências de 141 nucleotídeos do gene 3D da polimerase do Kobuvirus.



*kobuvírus detectado em ovinos

Fonte: BARRY et al. (2011).

1.2 AICHIVIRUS A

O *Aichivirus A* foi relatado pela primeira vez no Japão, em março de 1989, em um surto gastroentérico envolvendo pessoas que consumiram ostras no município de Aichi (YAMASHITA et al., 1991). Amostras de fezes foram analisadas e observou-se em cultura de células HeLa um novo tipo de vírus citopático atípico, com organização semelhante aos picornavírus, sendo classificado como novo membro da família *Picornaviridae* (YAMASHITA et al., 1991).

Yamashita e colaboradores (2000) e Ambert-Balay e colaboradores (2008) descreveram uma classificação para os *Aichivirus A* por meio de análise filogenética com base no segmento 3C/3D da polimerase viral, sendo dividido em três genótipos, denominados A, B e C, que apresentam até 90% de homologia.

Em humanos, a gastroenterite aguda é uma das doenças mais comuns e que causam a morte em todo o mundo (JONSSON et al., 2012). Assim como o rotavírus, calicivírus (norovírus e sapovírus), astrovírus e adenovírus, o aichivírus A tem sido considerado um novo patógeno gastroentérico (AMBERT-BALAY et al., 2008). Estudos detectaram alta soroprevalência (83%) entre humanos adultos com idade entre 19 e 39 anos (AMBERT-BALAY et al., 2008; REUTER et al., 2011).

O aichivírus A tem sido relatado em vários países. No Japão, um estudo revelou altas (87,7%) taxas na prevalência de anticorpos para o aichivírus A, com início da descrição em pessoas jovens (0-4 anos de idade) e revelando as maiores taxas de soroconversão na idade ente 20 até 40 anos de idade (YAMASHITA et al., 1993).

Na Europa, a infecção com o aichivírus A também apresentou altas taxas de soroprevalência na população estudada. Na Espanha, foram encontradas taxas de 40% de positividade em crianças com idade entre 2 a 4 anos, atingindo até 100% no grupo de indivíduos com até 40 anos de idade (RIBES et al., 2010). Na França, Goyer e colaboradores (2008) apresentam altas taxas de soroprevalência, aumentando de forma constante de 25% até 9 anos, 84% até 39 anos e 90% para indivíduos com até 100 anos. Pelas taxas de soroprevalência encontradas, o estudo concluiu que a maior parte das soroconversões ocorra antes dos 40 anos de idade.

As altas taxas de soroprevalência sugerem que o vírus pode circular no organismo sem causar sintomas ou ocasionar infecções brandas não perceptíveis, que não necessitem de intervenção médica (JONSSON et al., 2012).

Na Hungria, Reuter e colaboradores (2009a) encontraram apenas 1,5% (1/65) de amostras de fezes positivas para o aichivírus A em casos de gastroenterite não bacteriana em crianças hospitalizadas. Resultado semelhante foi encontrado na China onde 1,8% (8/445) das amostras fecais analisadas de crianças de 0 a 6 anos de idade, foram positivas para o aichivírus A (YANGY et al., 2009).

Na Índia, em estudo retrospectivo (5 anos), analisou amostras fecais de 1240 pacientes com até oito anos de idade apresentando diarreia sendo encontrado 1,1% (14/1240) incidência do vírus (VERMA et al., 2011). Todas as cepas de aichivírus A encontradas neste estudo pertenciam ao genótipo B (VERMA et al., 2011).

No Brasil a presença de aichivírus A foi descrito em Goiás (2006) em pacientes hospitalizados com sinal clínico de gastroenterite (OH et al. 2006). As cepas brasileiras de aichivírus A encontradas foram classificadas como pertences ao genótipo B. Oh

e colaboradores (2006) também analisaram amostras fecais de pacientes provenientes da Alemanha e as cepas obtidas deste país foram classificadas como genotipo A.

Na Suécia, o aichivírus A foi identificado em amostras fecais diarreicas de pacientes idosos (≥ 65 anos) com diagnóstico inconclusivo para gastroenterite. A frequência de diagnóstico viral foi de 1,4% (3/221). Resultado semelhante foi observado em um estudo realizado na Alemanha, onde 2% (10/499) de indivíduos adultos avaliados foram positivos para o aichivírus A (DREXLER et al., 2011; JONSSON et al., 2012).

O envolvimento do aichivírus A como um patógeno gastroentérico em humanos ainda é uma questão não definida, porém estudos apresentam a associação deste vírus com a doença entérica (AMBERT-BALAY et al., 2008; VERMA et al., 2011; JONSSON et al., 2012). A presença de coinfeção com outros vírus é frequentemente relatada, sendo o rotavírus (AMBERT-BALAY et al., 2008; VERMA et al., 2011) e os calicivírus (OH et al. 2006; AMBERT-BALAY et al., 2008) os agentes virais mais relacionados. Estes resultados revelam a necessidade de intensificar os estudos sobre os agentes responsáveis por distúrbios entéricos em humanos.

Técnicas de diagnóstico mais adequadas para a identificação, falhas de detecção devido à presença de outros agentes ou a forma assintomática da infecção são pontos que deverão ser analisados em estudos futuros (JONSSON et al., 2012).

1.3 KOBUVÍRUS BOVINO (*AICHIVIRUS B*)

O Kobuvírus bovino, atualmente denominado *Aichivirus B* (ICTV, 2013), foi descrito pela primeira vez no Japão em 2003 por Yamashita e colaboradores (2003), como um agente citopático em cultura de células Vero a partir de um meio suplementado com soro fetal bovino. Este soro era suspeito de estar contaminado com fezes contendo o Aichivírus B. Morfologicamente foi identificada semelhança com o Aichivírus A, porém os vírus eram geneticamente distintos (YAMASHITA et al., 2003).

Em um estudo realizado com 72 amostras de soro de um rebanho bovino assintomático, anticorpos contra o aichivírus B (U-I) foram identificados em 59,7% (43/72) dos animais analisados (YAMASHITA et al., 2003). Paralelamente, foram avaliadas por RT-PCR 72 amostras de fezes do mesmo rebanho sendo o RNA do aichivírus B identificado em 16,7% (12/72) das amostras. Com este estudo, Yamashita e colaboradores (2003) concluíram que o aichivírus B é um vírus presente em rebanhos bovinos do Japão.

Posteriormente, um estudo retrospectivo realizado em 2008 com amostras de fezes de bovinos com diarreia, no período de 2001 até 2004, na Tailândia (2008) a presença do aichivírus B foi observada em 8,3% (6/72) das amostras avaliadas (KHAMRIN et al., 2008). Todas as sequências genômicas parciais analisadas formaram um ramo distinto na árvore filogenética, com certa distância da cepa U-I. Este estudo relata a importância da identificação da presença de aichivírus B em outras regiões geográficas (KHAMRIN et al., 2008).

O kobuvírus bovino também foi identificado na Hungria, por Reuter e Egyed (2009), relatando 6,25% (2/32) de amostras positivas. O RNA de outros agentes virais como o rotavírus e o norovírus também foram identificados nessas mesmas amostras de fezes de animais assintomáticos. Ainda em 2009, Mauroy e colaboradores avaliaram a presença do aichivírus B em animais que apresentavam diarreia e detectaram coinfeção com norovírus bovino revelando a diversidade de patógenos entéricos que os animais podem abrigar e ressaltando a presença deste vírus na Bélgica, outro país da Europa.

Na Coreia, a detecção do aichivírus B foi mais prevalente, com 34,6% (37/107) de amostras fecais positivas (JEOUNG et al., 2011). A maior porcentagem de positividade 37,2% (32/86) foi encontrada em animais com diarreia (JEOUNG et al., 2011). Entretanto, a presença do aichivírus B não pode ser considerada como evidência para a manifestação de diarreia. Neste estudo, a presença de coinfeção com outros vírus como coronavírus, rotavírus e vírus da diarreia viral bovina também foi relatada. Porém, não é conhecido se a presença de outros vírus estão diretamente associados a infecção pelo aichivírus B (JEOUNG et al., 2011).

Também na Coreia, Park e colaboradores (2011) analisaram amostras fecais de bezerros e de animais adultos com diarreia. O resultado revela que a infecção foi mais prevalente em animais jovens, com a maior taxa de detecção, segundo sua classificação, nos bezerros (primeiro mês de vida) com 66,7% dos animais infectados. A detecção viral decresce com o aumento da idade, obtendo 25% (1/4) para a categoria jovem e 18,4% (9/49) de positivos para os animais adultos.

A maior taxa (77,8%) de ocorrência de RNA de aichivírus B identificada em fezes de bovinos foi relatada na Holanda. Entretanto, o pequeno número de amostras avaliadas ($n=7$) permite apenas afirmar a presença do vírus no país, não revelando a real prevalência do aichivírus B (BARRY et al., 2011).

No Brasil, até o presente momento não há relatos de estudos sobre a infecção por aichivírus B em rebanhos bovinos.

1.4 KOBUVÍRUS SUÍNO (AICHIVIRUS C)

A descrição do kobuvírus suíno (S-1-HUN), atualmente denominado, *Aichivirus C* (ICTV, 2013), em amostras fecais de suínos assintomáticos com menos de 10 dias na Hungria, foi ocasional (REUTER et al., 2008). O estudo visava detectar a presença de calicivírus nas fezes dos animais, no entanto uma nova espécie de kobuvírus foi identificada em todas as quinze amostras fecais de suínos avaliadas (REUTER et al., 2008).

A sequência de nucleotídeos e as análises filogenéticas conduzidas nas regiões 3C e 3D do genoma desta nova cepa viral detectada na Hungria revelaram semelhança com as cepas de aichivírus B e com o aichivírus A (REUTER et al., 2008). O resultado deste estudo possibilitou identificar a infecção em animais assintomáticos, com menos de 10 dias de vida e demonstrou a eliminação fecal do vírus por uma nova espécie animal (suíno), além de caracterizar a infecção como endêmica no rebanho avaliado (REUTER et al., 2008).

Um estudo realizado em 2008, na China, relatou 30,1% (97/322) das amostras fecais positivas para o aichivírus C (YU et al., 2009). Assim como o estudo realizado por Reuter e colaboradores (2008), os suínos eram jovens (< 15 dias de idade) e não apresentavam sinal clínico de gastroenterite.

O primeiro estudo relacionando o aichivírus C com a presença de diarreia ocorreu na Tailândia onde 99% (97/98) das amostras fecais de suínos foram positivas para o kobuvírus. Esses animais tinham idade entre 7 a 49 dias e eram provenientes de seis rebanhos (KHARMRIN et al., 2009). Neste estudo, as amostras foram analisadas quanto à presença de rotavírus, sendo todas negativas (KHARMRIN et al., 2009).

Na Coreia, a presença do aichivírus C foi avaliada em animais de várias faixas etárias com e sem sinal clínico de diarreia. Entre as categorias de idade, as amostras provenientes de leitões apresentaram maior taxa de positividade, com 97,8% (45/46) de animais infectados (PARK et al., 2010). Nos animais adultos, o RNA viral foi identificado em 44,4% (4/9) das amostras fecais. Em relação à presença de diarreia, as taxas de detecção encontradas nos animais com sinal clínico foram superiores em todas as categorias analisadas em comparação com os animais que não manifestavam a diarreia. Este estudo revela uma relação significativa entre a presença de aichivírus C e a manifestação da gastroenterite (PARK et al., 2010).

O estudo de Park e colaboradores (2010) encontrou prevalência de 3,57% (3/71) nas amostras avaliadas identificando o aichivírus C como o único agente. O rotavírus foi o agente encontrado com maior frequência nas coinfeções, estando presente em 41,67%

das amostras. Dessa forma, este estudo ressalta que novas pesquisas devem ser realizadas para a confirmação das interações do aichivírus C com outros micro-organismos patogênicos para a manifestação de gastroenterite nos suínos (PARK et al., 2010).

O estudo de Dufkova e colaboradores (2013) analisaram amostras de animais saudáveis de várias faixas de idade, e ao contrário do estudo de Park e colaboradores (2010) encontrou o aichivírus C sozinho com maior frequência de 87,3% (171/196) em relação aos outros vírus analisados (astrovírus e sapovírus).

Estudos em animais assintomáticos também já foram realizados no Japão onde 45,4% (133/293) dos animais continham o vírus nas fezes, com maior ocorrência de amostras positivas provenientes de animais ≤ 6 meses de idade (KHAMRIN et al., 2010). A análise do estudo revela que a presença deste vírus pode ser comum em rebanhos aparentemente saudáveis, sendo mais comumente encontrado em animais jovens (KHAMRIN et al., 2010).

Reuter e colaboradores (2010) analisaram, além de amostras fecais, alíquotas de soro pareadas do mesmo rebanho, dividindo os animais em quatro faixas etárias. Com relação às amostras fecais, 53,3% (32/60) continham o RNA do aichivírus C. Nas amostras de soro o aichivírus C foi identificado em 26,6% (16/60). O aichivírus C foi encontrado em todas as categorias analisadas e em apenas nove amostras o vírus foi encontrado em amostras pareadas (fezes e soro).

No Brasil, Barry e colaboradores (2011) realizaram um estudo similar ao estudo de Reuter e colaboradores (2010) e seus resultados revelaram a presença do aichivírus C nos rebanhos suínos brasileiros. Os leitões foram os mais acometidos com 87,5% (56/64) de amostras fecais positivas. No soro, as taxas de detecção encontrada alcançaram 100% dos animais avaliados. Este estudo aponta alto índice de animais com viremia para o aichivírus C, inclusive com valores superiores aos encontrados no estudo da Hungria (REUTER et al., 2010).

Para justificar a presença do aichivírus C no soro dos animais, Reuter e colaboradores (2010) apontam outras formas de transmissão do vírus, além da via fecal-oral, poderiam ser consideradas, por exemplo, sangue, urina, leite, saliva e alimentos que poderiam contribuir com a contaminação ambiental. Este estudo também sugere que a presença do aichivírus C na corrente sanguínea seja ocasionada pelo escape do vírus do trato gastrointestinal em animais imunocompetentes, o que resultaria em viremia.

A região VP1 é empregada como critério de classificação taxonômica para diversos gêneros da família *Picornaviridae* (DREXLER et al., 2008). Em 2011, YU e

colaboradores (2011) desenharam um par de *primer* para amplificar e analisar esta região do genoma viral. Neste estudo, foram analisadas 11 sequências genômicas da região VP1 de cepas de aichivírus C descritas sendo observados 86,7% a 100% de semelhança entre elas. Essas sequências apresentaram ainda 88,62% de identidade de nucleotídeos com a cepa S-1-HUN, descrita na Hungria; 58,66% com a cepa de aichivírus BU-I, e apenas, 48,86% com o protótipo humano (*Aichivirus A*) (YU et al., 2011). Na árvore filogenética as cepas de aichivírus C provenientes da China agruparam-se com as outras cepas de aichivírus C já descritas, o que sugere que estas estirpes formam uma nova espécie de kobuvírus (YU et al., 2011).

Também na China, por análise filogenética de uma sequência genômica completa de aichivírus C (SH-W-CHN) as regiões VP1 e 3D viral foram comparadas com a sequência da cepa viral identificada na Hungria (S-1-HUN), obtendo semelhança de 82% e 93% em identidade de nucleotídeos. Com relação à cepa descrita na China (Y-1-CHI) a identidade de nucleotídeo foi de 83% e 92%. Este estudo demonstrou alguma semelhança parental entre as cepas analisadas (WANG et al., 2012). Esta análise possibilitou concluir que a região mais variável do genoma viral é a região VP1 sendo a região 3D a mais conservada. Também pela posição que as sequências apresentaram-se na árvore filogenética pode-se concluir a existência de diversidade em relação às cepas de aichivírus C de acordo com a origem geográfica (WANG et al., 2012).

Em 2012, foi descrita na China a cepa CH/HNXX-4/2012, uma possível variante do aichivírus C que contém a inclusão de um aminoácido (treonina) na posição 239 e deleção de 30 aminoácidos na região 2B. Os mecanismos responsáveis por esta evolução viral podem ser outros vírus já existentes ou ainda, fatores ambientais que podem estar envolvidos neste processo (CAO et al., 2012).

A identificação dos kobuvírus ocasionando infecções em seres humanos e animais pode ser considerada recente. Com isso, os estudos de caráter epidemiológico, clínico, molecular e antigênico envolvendo cepas de kobuvírus são poucos e, por isso mesmo inconclusivo.

Com relação à produção animal, no Brasil, apenas o nosso grupo de pesquisa, recentemente relatou a presença do vírus em suínos. Considerando a importância de duas cadeias produtivas representadas pela bovinocultura (corte/leite) e suinocultura, no contexto do agronegócio brasileiro, estudos adicionais e complementares fazem-se necessários. Em particular, devem ser considerados os impactos das infecções singulares por

kobuvírus e de coinfeções com outros enteropatógenos na saúde intestinal de animais de produção.

A caracterização molecular das cepas virais identificadas destaca-se ainda no aspecto relacionado às infecções homólogas e heterólogas, além da possibilidade de transmissão interespecie e, em especial a avaliação do potencial zoonótico dos kobuvírus animais.

1.5 REFERÊNCIAS

AMBERT-BALAY, K.; LORROT, M.; BON, F.; GIRAUDON, H.; KAPLON, J.; WOLFER, M.; LEBON, P.; GENDREL, D.; POTHIER, P. Prevalence and genetic diversity of Aichi virus strains in stool samples from community and hospitalized patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1252-1258, 2008.

BARRY, A.F.; RIBEIRO, J.; ALFIERI, A.F.; van der Poel, W.H. First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p.1811-1814, 2011.

CAO, W.; ZHENG, H.; ZHANG, K.; JIN, Y.; LV, LV.; YANG, F.; LIU, X. Complete genome sequence of the porcine kobuvirus variant CH/HNXX-4/2012. **Journal of Virology**, v.86, p.11947, 2012.

DI MARTINO, B.; DI PROFIO, F.; DI FELICE, E.; CECI, C.; PISTILLI, M.G.; MARSILIO, F. Molecular detection of bovine kobuviruses in Italy. **Archives of Virology**, v.157, p.2393-2396, 2012.

DREXLER, J.F.; LUNA, L.K.S.; STOCKER, A.; ALMEIDA, P.S.; RIBEIRO, T.C.M.; PETERSEN, N.; HERZOG, P.; PEDROSO, C.; HUPPERTZ, H.I.; RIBEIRO JUNIOR, H.C.; BAUMGARTE, S.; DROSTEN, C. Circulation of 3 lineages of a novel Saffoldcardiovirus in humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1398-1405, 2008.

DREXLER, J.F.; BAUMGARTE, S.; LUNA, L.K.S.; ESCHBACH-BLUDAU, M.; LUKASHEV, A.N.; DROSTEN, C. Aichi virus shedding in high concentrations in patients with acute diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p.1544-1548, 2011.

DUFKOVA, L.; SCIGALKOVA, I.; MOUTELIKOVA, R.; MALENOVSKA, H.; PRODELALOVA, J. Genetic diversity of porcine sapoviruses, kobuviruses, and astroviruses in asymptomatic pigs: an emerging new sapovirus III genotype. **Archives of Virology**, v.158, p.549-558, 2013.

GOYER, M.; AHO, L-S.; BOUR, J-B.; AMBERT-BALAY, K.; POTHIER, P. Soroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006-2007. **Archives of Virology**, v.153, p.1171-1174, 2008.

HICKS, A.L.; DUFFY, S. Genus-specific substitution rate variability among picornaviruses. **Journal of Virology**, v.85, p.7942-7947, 2011.

ICVT – International Committee on Taxonomy of Viruses.

<<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>> Acesso em: 15 de Janeiro de 2013.

JEOUNG, H-Y.; LIM, J-A.; JEONG, W.; OEM, J-KU.; NA, D-J. Three clusters of bovine kobuvirus isolated in Korea, 2008-2010. **Virus Genes**, v.42, p.402-406, 2011.

JONSSON, N.; WAHLSTROM, K.; SVENSSON, L.; SERRANDER, L.; LINDBERG, A.M. Aichi virus infection in elderly people in sweden. **Archives of Virology**, v.157, p.1365-1369, 2012.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; PEERAKOME, S.; OKITSU, S.; MIZUGUCHI, M.; USHIJIMA, H. Bovine kobuviruses from cattle with diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.985-986, 2008.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; KONGKAEW, A.; KONGKAEW, S.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Porcine kobuvirus in piglets, Thailand. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.2075-2076, 2009.

KHAMRIN, P.; MANEEKARN, N.; HIDAKA, S.; KISHIKAWA, S.; USHIJIMA, K.; OKITSU, S.; USHIJIMA, H. Molecular detection of kobuvirus sequences in stool samples collected from healthy pigs in Japan. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10, p.950-954, 2010.

LEE, M.H.; JEOUNG, H.Y.; LIM, J.A.; SONG, D.S.; NA, D.J. Kobuvirus in south Korean Black goats. **Virus Genes**, v.45, p.186-189, 2012.

LI, L.; VICTORIA, J.G.; WANG, C.; JONES, M.; FELLERS, G.M.; KUNZ, T.H.; DELWART, E. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. **Journal of Virology**, v.84, p.6955-6965, 2010.

LI, L.; PESAVENTO, P.A.; SHAN, T.; LEUTENEGGER, C.M.; WANG, C.; DELWART, E. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. **Journal of General Virology**, v.92, p.2534-2541, 2011.

MAUROY, A.; SCIPIONI, A.; MATHIJS, E.; THYS, C.; THIRY, E. Molecular detection of kobuvirus and recombinant noroviruses in cattle in continental Europe. **Archives of Virology**, v.154, p.1841-1845, 2009.

OH, D-Y.; SILVA, P.A.; HAUROEDER, B.; DIEDRICH, S.; CARDOSO, D.D.P.; SCHREIER. Molecular characterization of the first Aichi viruses isolated in Europe and in South America. **Archives of Virology**, v.151, p.1199-1206, 2006.

OIE – World Organisation for Animal Health

<http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.05_FMD.pdf> Acesso em: 25 de Fevereiro de 2013.

OKITSU, S.; KHAMRIN, P.; THONGPRACHUM, A.; HIDAKA, S.; KONGKAEW, A.; MANEEKARN, N.; MIZUGUCHI, M.; HAYAKAWA, S.; USHIJIMA, H. Sequence analysis of porcine kobuvirus VP1 region detected in pigs in Japan and Thailand. **Virus Genes**, v.44, p.253-257, 2012.

PARK, S-J.; KIM, H-K.; MOON, H-J.; SONG, D-S.; RHO, S-M.; HAN, J-Y.; NGUYEN, V-G.; PARK, B-K. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea. **Archives of Virology**, v.155, p.1803-1811, 2010.

PARK, S-J.; KIM, H-K.; SONG, D-S.; MOON, H-J.; PARK, B-K. Molecular detection and genetic characterization of kobuviruses in fecal samples collected from diarrheic cattle in Korea. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p.1178-1182, 2011.

REUTER, G.; BOLDIZSAR, A.; KISS, I.; PANKOVICS, P. Candidate new species of kobuvirus in porcine hosts. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1968-1970, 2008.

REUTER, G.; BOLDIZSAR, A.; PAPP, G.; PANKOVICS, P. Detection of Aichi virus shedding in a child with enteric and extraintestinal symptoms in Hungary. **Archives of Virology**, v.154, p.1529-1532, 2009a.

REUTER, G.; EGYED, L. Bovine kobuvirus in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.822-823, 2009.

REUTER, G.; KECSKEMETI, S.; PANKOVICS, P. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p.696-698, 2010.

REUTER, G.; BOROS, A.; PANKOVICS, P.; EGYED, L. Kobuvirus in Domestic sheep, Hungary. **Emerging Infectious Disease**, v.16, p.869-870, 2010b.

REUTER, G.; BOROS, A.; PANKOVICS, P. Kobuviruses - a comprehensive review. **Reviews in Medical Virology**, v.21, p.32-41, 2011.

REUTER, G.; NEMES, C.; BOROS, A.; KAPUSINSZKY, B.; DELWART, E.; PANKOVICS, P. Porcine kobuvirus in wild boars (*Sus scrofa*). **Archives of Virology**, v.158, p.281-282, 2013.

RIBES, J.M.; MONTAVA, R.; TÉLLEZ-CASTILHO, C.J.; JIMÉNEZ, M.F.; BUESA, J. Soroprevalence of Aichi virus in a Spanish population from 2007 to 2008. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, p.545-549, 2010.

Viral Zone - <http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/652.html> Acesso em: 14 de Janeiro de 2013.

VERMA, H.; CHITAMBAR, S.D.; GOPALKRISHNA, V. Circulation of Aichi virus genotype B strains in children with acute gastroenteritis in India. **Epidemiology Infection**, v.139, p.1687-1691, 2011.

VERMA, H.; MOR, S.K.; MOSTAFA, Y.; ABDEL-GLIL, M.Y.; GOYAL, S.M. Identification and molecular characterization of *porcine kobuvirus* in U. S. swine. **Virus Genes**, 2013. DOI 10.1007/s11262-013-0879-1.

YAMASHITA, T.; KOBAYASHI, S.; SAKAE, K.; NAKATA, S.; CHIBA, S.; ISHIHARA, Y.; ISOMURA, S. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. **Journal of Infectious Diseases**, v.164, p.954-957, 1991.

YAMASHITA, T.; SAKAE, K.; ISHIHARA, Y.; ISOMURA, S.; UTAGAWA, E. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.2938-2943, 1993.

YAMASHITA, T.; SUGIYAMA, M.; TSUZUKI, H.; SAKAE, K.; SUZUKI, Y.; MIYAZAKI, Y. Application of a reverse transcription-PCR for identification and differentiation of Aichi virus, a new member of the picornavirus family associated with gastroenteritis in humans. **Journal of General Virology**, v.38, p.2955-2961, 2000.

YAMASHITA, T.; ITO, M.; KABASHIMA, Y.; TSUZUKI, H.; FUJIURA, A.; SAKAE, K. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. **Journal of General Virology**, v.84, p.3069-3077, 2003.

YANG, S.; ZHANG, Z.; ZHU, J.; CUI, L.; HUA, X. Aichi virus strains in children with gastroenteritis, China. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.1703-1705, 2009.

YU, J-M.; JIM, M.; ZHANG, Q.; LI, H-Y.; LI, D-D.; XU, Z-Q.; LI, J-S.; CUI, S-X.; YANG, S-H.; LIU, N.; DUAN, Z-J. Candidate porcine kobuvirus, China. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.823-825, 2009.

YU, J-M.; XU, Z-Q.; LI, B-W.; ZHANG, Q.; CUI, S-X.; JIM, M.; DUAN, Z-J. Analysis and characterization of the complete genome of a member of a new species of kobuvirus associated with swine. **Archives of Virology**, v.156, p.747-751, 2011.

WANG, C.; LAN, D.; CUI, LI.; YANG, Z.; YUAN, C.; HUA, X. Molecular characterization of a porcine kobuvirus strain in China. **Archives of Virology**, v.157, p.573-578, 2012.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar por meio da técnica de RT-PCR parâmetros da infecção por *Aichivirus B* e *C* em bovinos e suínos, respectivamente, provenientes das principais regiões produtoras brasileiras.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar pela técnica de RT-PCR a presença do RNA de *Aichivirus B* e *C* em amostras de fezes de bovinos e suínos, respectivamente;
- Determinar a frequência de ocorrência do *Aichivirus B* e *C* nas principais regiões produtoras do Brasil;
- Em bovinos, determinar parâmetros da infecção como categoria animal (bezerros / adultos), aptidão (corte / leite) com maior frequência de ocorrência da infecção pelo *Aichivirus B*;
- Determinar a taxa de infecção pelo *Aichivirus C* em leitões lactentes com uma a três semanas de idade;
- Com base em um produto com 219 pb do gene RdRp de kobuvirus realizar inferências filogenéticas em cepas de *Aichivirus B* e *C* identificadas em amostras de fezes de bovinos e suínos, respectivamente, provenientes de rebanhos brasileiros.

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 ARTIGO 1. KOBUVIRUS (AICHIVIRUS B) INFECTION IN BRAZILIAN CATTLE HERDS

3.1.1 Abstract: There are few studies involving the detection of *Aichivirus B* in cattle herds worldwide and this virus has never been diagnosed in Brazil. This study evaluated 222 diarrheic fecal samples collected in the period February/2010 to May/2012. The sampling included fecal samples from four geographical regions (South, Southeast, Midwest, and North) of Brazilian with higher activity of bovine livestock. To evaluate the frequency of occurrence in different types of livestock were evaluated fecal samples from beef ($n=105$) and dairy ($n=117$) cattle herds. To determine the category of the animal more susceptible to infection, the sampling included fecal samples from young ($n=182$) and adults animals ($n=40$). The fragment of 219 bp of the *Aichivirus* RdRp gene was amplified by RT-PCR assay in 18.2% (40/222) of the fecal samples evaluated in both beef and dairy cattle animals. The highest ($P \leq 0.05$) detection rate (20.9%; 38/182) of the *Aichivirus B* RNA was found in young animals, while in adult cattle the RNA of the virus was detected in 5% (2/40) of the fecal samples. The nucleotide sequencing analysis of the three amplicons showed that the Brazilian *Aichivirus B* strains clustered in a distinct branch in the phylogenetic tree of the European and Asiatic strains. To our knowledge, this is the first description of *Aichivirus B* infection in Brazilian cattle herds.

Keywords: Bovine. Diarrhea. Dairy cattle. Beef cattle. RT-PCR. Enteric picornaviruses

3.1.2 Introduction

The genus *Kobuvirus* belong to the *Picornaviridae* family and the virions are non-enveloped, with icosahedral symmetry and a diameter of 27-30 nm. The virus genome consists of single-stranded positive-sense RNA with size ranging from 8.2 to 8.4 Kb (Reuter et al., 2011).

Currently, the *Kobuvirus* genus included three species, designated as *Aichivirus A*, *Aichivirus B*, and *Aichivirus C* that can cause infections in humans, cattle, and pigs, respectively (ICTV, 2013).

The *Aichivirus A* (A846/88 strain) was firstly isolated in 1989 from a patient with nonbacterial acute gastroenteritis in an outbreak in Japan. The cases were associated with consumption of oysters (Yamashita et al., 1991). Also in Japan, during the year 2003, the *Aichivirus B* (U-I strain) was detected in bovine serum and fecal samples from clinically healthy cattle (Yamashita et al., 2003). In 2007, the *Aichivirus C* (S-1-HUN strain) was identified in a healthy pig in Hungary (Reuter et al., 2008).

In addition to humans, cattle, and pigs infections of the kobuvirus have been described in others animal species such as dog (Li et al., 2011), bat (Li et al., 2010), wild boar

(Reuter et al., 2013), and sheep (Reuter et al., 2010). There is the possibility of the kobuvirus be diagnosed in wild animals (Reuter et al., 2011).

There are few studies involving the detection of *Aichivirus B* in cattle. In Thailand, this virus has been detected in diarrheic fecal samples of calves between 7 to 49 days of age (Khamrin et al., 2008). In Korea, Park et al. (2011) analyzed fecal samples from cattle with diarrhea. The highest presence of *Aichivirus B* in calves in relative to adults. Jeoung et al. (2011) identified this virus in fecal samples of symptomatic and asymptomatic calves (≤ 30 -day-old).

In Europe, epidemiological studies were conducted in animals with (Mauroy et al., 2009) and without (Di Martino et al., 2012) diarrhea showing the presence of *Aichivirus B*.

In Hungary, the presence of this virus in adult cattle was also described by Reuter et al. (2009). In Netherlands, analyzing a small number of the fecal samples Barry et al. (2011) reported high infection rate of *Aichivirus B* infection rate in Netherlands.

The kobuvirus is considered a new enteric virus, and the clinical consequences of the infection caused by this agent are not yet established in Brazil. The aim of this study is to evaluate the prevalence of the *Aichivirus B* in fecal samples in Brazilian cattle herds.

3.1.3 Materials and Methods

3.1.3.1 Inclusion criteria

The fecal samples included in this study ($n=222$) are from a collection of diarrheic samples collected during February/2010 to May/2012. The sampling was representative of the four main geographical regions of Brazil (South, Southeast, Midwest, and North) with higher activity of bovine livestock. A second criterion for inclusion in order to evaluate the frequency of occurrence of kobuvirus infection in different types of livestock were selected fecal samples from beef ($n=105$) and dairy ($n=117$) cattle herds. Finally, to determine the category of the animal more susceptible to infection diarrheic fecal samples from young (calves less than ≤ 60 days, $n=182$) and adult animals (age ≥ 1 year, $n=40$) were selected. The Table 1 shows the distribution of diarrheic fecal samples included in this study according to the origin and age of the animals.

3.1.3.2 RNA extraction

Fecal suspensions were prepared at 10-20% (w/v) in 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 (137 mM NaCl; 3mMKCl; 8mM Na₂HPO₄; 14 mM KH₂PO₄), and centrifuged at 3,000 x g for 5 min. The RNA extraction was realized with 400 µL of fecal suspensions using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate methods (Alfieri et al., 2006). The RNA was eluted in 50 µL of ultra-pure RNase-free DEPC-treated sterile water. Sterile water was included as negative control in all viral RNA extraction procedures.

3.1.3.3 Kobuvirus detection

The RT-PCR was performed using the primers UNIV-kobu-F/R that were designed based on *Kobuvirus* strains, and target a region of the RdRp gene with 216bp (Reuter et al., 2009). The RT-PCR products were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), stained with ethidium bromide, and visualized under UV light.

3.1.3.4 Sequencing and phylogenetic analysis

Three RT-PCR products amplified from fecal samples of calves with ≤ 60 days of age were purified using the GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), quantified in a QubitTM Fluorometer (Invitrogen Life Technologies, Eugene, OR, USA) and sequenced in an ABI3500 Genetic Analyser using the forward and reverse primers with the BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequence quality analysis was carried out using Phred software and the contig assembly was obtained using the CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Sequence similarities were performed using the BLASTn software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), to verify the nucleotide similarity with sequences that are deposited in GenBank. The phylogenetic tree and the nucleotide matrix identity were realized using the MEGA version 5.10 and Bioedit version 7.0.5.3 software, respectively. The analyses were based on the neighbor-joining method from the Tamura-Nei model. Bootstrapping was statistically supported with 1,000 replicates. The

referenced sequences included in this study were acquired from the National Center for Biotechnology Information, USA (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>).

Statistical analysis was performed with EpiInfoTM to compare the proportions of *Aichivirus B* positive samples among two categories: animals age (calves x adult) and cattle type (dairy x beef). The analysis was performed using the Chi-square (χ^2) test or Fisher's exact test. The confidence limit for the statistical tests was set at 95% ($P < 0.05$).

3.1.4 Results

A product of 216 bp of the kobuvirus RdRp gene was amplified from 18.2% (40/222) diarrheic fecal samples. *Aichivirus B* positive fecal samples originated from Brazilian geographical regions and states sampled evaluated (Table 2).

The Table 3 show the distribution of diarrheic fecal samples positive for *Aichivirus B* collected in beef and dairy cattle herds and in calves and adult animals. The frequency of positive fecal samples from calves was statistically higher than in adult animals ($P = 0.0367$).

The sequence analysis from three selected RT-PCR amplicons from calves (≤ 60 -days-old) confirmed that the amplified product were *Aichivirus B* specific. The three sequences (BRA09/2011, BRA1682/2011, and BRA55/2012) analyzed in this study formed a new branch in the phylogenetic tree (Figure 1). The BRA09/2011 strain showed high nucleotide identity (92.6%) with Korean strain (HQ650196), while the BRA1682/2011 and BRA55/2012 strains presented high nucleotide identity (92.6% and 93.9%, respectively), with the Thailand (EF659450) and Japanese (EF659451) strains. The gene sequences described in the present study have been deposited in the GenBank database under accession numbers: KC921389 - KC921391.

3.1.5 Discussion

The RNA of *Aichivirus B* was detected in all Brazilian regions included in this study, and represents the first detection this virus in Brazil. Similar rates of *Aichivirus B* infection was detected in the three regions; South (19.17%), Southeast (23.1%), and North (20%). The Midwest region showed the lowest detection rate (9.76%). These result suggest that the infection is disseminated in Brazilian cattle herds.

The *Aichivirus B* was detected in 58% (21/36) of the cattle herds evaluated (data not shown) and the all regions included in the survey had at least one infected herd. The Paraná State demonstrated the highest rate of virus detection, with 50% of positive herds, which shows the wide spread of *Aichivirus* infection in cattle herds of this state. Comparing the two types of livestock production, the highest (22.2%; 26/117) detection rate of *Aichivirus B* positive diarrheic fecal samples was found in dairy herds while that in beef cattle herds the virus was found 13.3% (14/105) of the samples. However, there was no statistical difference ($P \geq 0.05$) between the presence of this virus in the dairy and beef herds.

The *Aichivirus B* have been detected in Japan (Yamashita et al., 2003), Thailand (Khamrin et al., 2008) and, Italy (Di Martino et al., 2012) but there are no studies about the detection of this virus in Brazilian dairy and/or beef cattle herds. In Thailand, Khamrin et al. (2008) detected 8.3% (6/72) of positive fecal samples for the *Aichivirus B*. The present study found 18% (40/222) of positive fecal samples for this enteric picornaviruses the highest value reported in cattle with clinic signs of diarrhea.

Studies in other countries describe the presence of this virus as a common enteric pathogen of animals. The *Aichivirus B* was present in 7 out of 142 (4.9%) in Italy (Di Martino et al., 2012), 32 out of 86 (37.2%) in Korea (Jeoung et al., 2011) and in 7 out of 9 (77.8%) fecal samples of the bovines analyzed in Netherlands (Barry et al., 2011). The *Aichivirus B* was detected in 20.9% (38/182) of fecal samples from calves with ≤ 60 days of age, while studies realized in Korea found 40.9% and 66.7% (Jeoung et al., 2011; Park et al., 2011). The high prevalence of infection in young animals can be explained because this virus belongs to the group of agents responsible for neonatal disease, similarly as observed in humans, where the highest positive rate for *Aichivirus A* is found in younger people. There are few studies analyzing the presence of *Aichivirus B* in adult animals with diarrhea. In this study, values showed statistical difference in relation to young animals compared with adults ($P \geq 0.05$) (Table 2).

In Hungary, Reuter et al. (2009) described that 6.25% (2/32) of the 1-year-old animals were positive for the *Aichivirus B*. In the present study, this virus was identified only in 5% (2/40) of diarrheic fecal samples from animals older than 1 year. In Korea, Park et al. (2011) also showed 18.4% (9 out of 49) of *Aichivirus B* detection in adult animals compared to calves. As well as in cattle, in pigs the percentage of positive decreased with increasing age of the animals (An et al., 2011; Barry et al., 2011).

The highest rate of positive results to *Aichivirus B* is found in animals with clinical signs of diarrhea (Jeoung et al., 2011; Di Martino et al., 2012). The presence of

gastroenteritis by aichivirus has been mentioned by Park et al. (2011) who reported high detection rate of this agent associated with gastroenteritis in 36% (13/36) of the farms evaluated. However, some studies have related this virus in asymptomatic animals (Reuter et al., 2009; Di Martino et al., 2012).

The sequencing analysis of three amplicons confirmed the presence of *Aichivirus B* RNA in the fecal samples. The Brazilian *Aichivirus B* strains formed a distinct branch in the phylogenetic tree compared with the sequences belonging to other countries, not grouping with strains from the Japan, Italy, Korea, and Netherlands.

In humans the isolates of *Aichivirus A* have been found only in patients with gastroenteritis, as well as in swine, also in cattle there are studies relating the presence of this virus in cases of gastroenteritis (Yamashita et al., 2003; Jeoung et al., 2011). However, it is not confirmed that the *Aichivirus B* are responsible for causing gastroenteritis in cattle.

However, the explanation for the involvement of *Aichivirus B* as a pathogen not well elucidated. Consequently experimental infections in gnotobiotic animals are necessary to know the involvement of this virus as an enteric agent in cattle herds.

In conclusion, this is the first detection of the *Aichivirus B* in Brazilian cattle herds. This virus was detected in all four geographical regions and eight states included in this study suggest that this enteric virus in dairy and beef cattle herds in all over the country.

3.1.6 Acknowledgements

This study was supported by Brazilian institutes: National Counsel of Scientific and Technological Development (CNPq); Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES); Financing of Studies and Projects (FINEP); and the Araucária Foundation (FAP/PR). Alfieri, A.A. and Alfieri, A.F. are recipients of CNPq fellowships.

Table 1 – Distribution of diarrhoeic samples by geographical location, creation system and age used to detect kobuvirus.

Origin		Sampling (n)			
Region	State	Herd		Samples	
		Dairy	Beef	Calves	Adult
South	Paraná	22	4	83	37
Southeast	Minas Gerais	1	-	20	-
	São Paulo	1	-	6	-
Midwest	Goiás	3	-	13	3
	Mato Grosso	-	1	20	-
	Mato Grosso do Sul	-	1	5	-
North	Rondônia	2	-	15	-
	Pará	-	1	20	-
Total		29	7	182	40

Table 2 – Positive diarrheic fecal samples of beef and dairy cattle for *Aichivirus B* in the four Brazilian geographical regions.

Geographic region *	Samples		Total (%)
	Positive/ Total		
	Beef	Dairy	
South	4/45	19/75	23/120 (19.2)
Southeast	-	6/26	6/26 (23.1)
Midwest	3/25	1/16	4/41 (9.8)
North	7/35	-	7/35 (20.0)

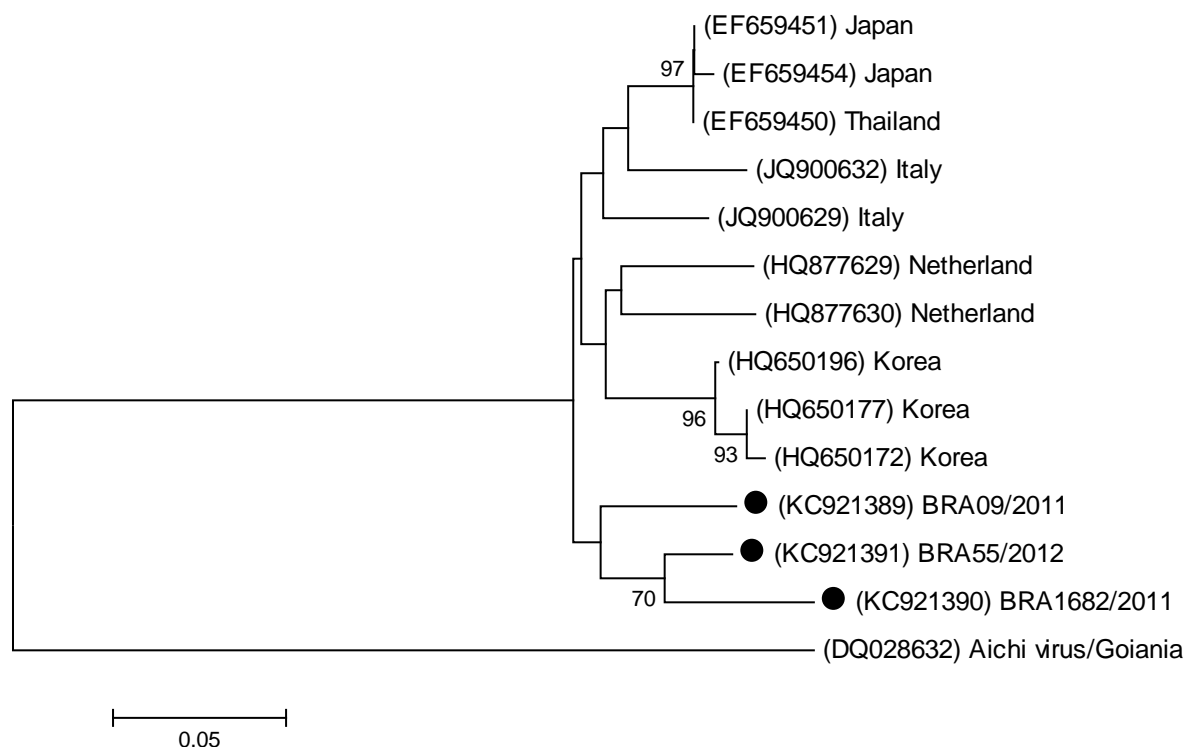
*States: South (Paraná); Southeast (Minas Gerais and São Paulo); Midwest (Goiás, Mato Grosso, and Mato Grosso do Sul); North (Pará).

Table 3 – Detection of *Aichivirus B* by RT-PCR assay in diarrheic fecal samples of young and adult animals of Brazilian beef and dairy cattle herds.

Age group	Cattle herds				Animals evaluated	
	Beef		Dairy		Total	Positive (%)
	Total	Positives (%)	Total	Positive (%)		
Calves	68	13 (19.1 ^c)	114	25 (21.9 ^c)	182	38 (20.9 ^a)*
Adult	37	1 (2.7)	3	1 (33.3)	40	2 (5.0 ^b)*
Total	105	14 (13.3^d)	117	26 (22.2^d)	222	40 (18.2)

* The same letter in the same line indicate non-significant values and different letters in different lines indicate significant values ($P \leq 0.05$).

Figure 1 – Phylogenetic analysis of partial nucleotide sequence (nt 203) of the RdRp gene of *Kobuvirus*. The tree was generated using the neighbor-joining method and Tamura-Nei as nucleotide substitution model. Bootstraps values (1,000 replicates) higher than 70% are shown. The Brazilian strains of kobuvirus (*Aichivirus B*) described in this study are marked with a circle. One *Aichivirus A* Brazilian strain of human origin was used as the outgroup.



3.1.7 References

ALFIERI, A.A., PARAZZI, M.E., TAKIUCHI, E., MÉDICI, K.C., ALFIERI, A.F. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. **Tropical Animal Health Production**, v.38, p.521-526, 2006.

AN, D-J., JEOUNG, H-Y., JEONG, W., LEE, H.S., PARK, J-Y., KIM, B. Porcine kobuvirus from pig stool in Korea. **Virus Genes**, v.42, p.208-211, 2011.

BARRY, A.F., RIBEIRO, J., ALFIERI, A.F., VAN DER POEL, W.H. First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p.1811-1814, 2011.

DI MARTINO, B., DI PROFIO, F., DI FELICE, E., CECI, C., PISTILLI, M, G., MARSILIO, F. Molecular detection of bovine kobuviruses in Italy. **Archives of Virology**, v.157, p.2393-2396, 2012.

ICVT – *International Committee on Taxonomy of Viruses*.

<<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?bhcp=1>> Accessed in: January of 2013.

JEOUNG, H-Y., LIM, J-A., JEONG, W., OEM, J-KU., NA, D-J. Three clusters of bovine kobuvirus isolated in Korea, 2008-2010. **Virus Genes**, v.42, p.402-406, 2011.

KHAMRIN, P., MANEEKARN, N., PEERAKOME, S., OKITSU, S., MIZUGUCHI, M., USHIJIMA, H. Bovine Kobuviruses from Cattle with Diarrhea. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.985-986, 2008.

LI, L., VICTORIA, J.G., WANG, C., JONES, M., FELLERS, G. M., KUNZ, T. H., DELWART, E. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. **Journal of Virology**, v.84, p.6955-6965, 2010.

LI, L., PESAVENTO, P.A., SHAN, T., LEUTENEGGER, C.M., WANG, C., DELWART, E. Viruses in diarrhoeic dogs include novel kobuviruses and sapoviruses. **Journal of General Virology**, v.92, p.2534-2541, 2011.

MAUROY, A., SCIPIONI, A., MATHIJS, E., THYS, C., THIRY, E. Molecular detection of kobuvirus and recombinant noroviruses in cattle in continental Europe. **Archives of Virology**, v.154, p.1841-1845, 2009.

PARK, S-J., KIM, H-K., SONG, D-S., MOON, H-J., PARK, B-K. Molecular detection of characterization of kobuviruses in fecal samples collected from diarrheic cattle in Korea. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11, p.1178-1182, 2011.

REUTER, G., BOLDIZSAR, A., KISS, I., PANKOVICS, P. Candidate new species of kobuvirus in porcine hosts. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1968-1970, 2008.

REUTER, G., EGYED, L. Bovine kobuvirus in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, p.822-823, 2009.

REUTER, G., BOROS, A., PANKOVICS, P., EGYED, L. Kobuvirus in domestic sheep, Hungary. **Emerging Infectious Disease**, v.16, p.869-870, 2010.

REUTER, G., BOROS, A., PANKOVICS, P. Kobuviruses - A comprehensive review. **Reviews in Medical Virology**, v.21, p.32-41, 2011.

REUTER, G., NEMES, C., BOROS, A., KAPUSINSZKY, B., DELWART, E., PANKOVICS, P. Porcine kobuvirus in wild boars (*Sus scrofa*). **Archives of Virology**, v.158, p.281-282, 2013.

YAMASHITA, T., KOBAYASHI, S., SAKAE, K., CHIBA, S., ISHIHARA, Y., ISOMURA, S. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. **Journal of Infectious Disease**, v.164, p.954-957, 1991.

YAMASHITA, T., ITO, M., KABASHIMA, Y., TSUZUKI, H., FUJIURA, A., SAKAE, K. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle. **Journal of General Virology**, v.84, p.3069-3077, 2003.

3.2 ARTIGO 2

Trop Anim Health Prod
DOI 10.1007/s11250-013-0428-x

REGULAR ARTICLES

High frequency of *Aichivirus C* (porcine kobuvirus) infection in piglets from different geographic regions of Brazil

Juliane Ribeiro · Raquel de Arruda Leme ·
Alice Fernandes Alfieri · Amauri Alcindo Alfieri

Accepted: 21 May 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract The aim of this study was to evaluate the frequency of *Aichivirus C* infection in the three major industrial pig-producing regions of Brazil. This retrospective study evaluated 63 faecal samples that were collected between 2004 and 2011 from suckling piglets (1 to 3 weeks old) belonging to 46 pig herds located in the South, Southeast and Central-west regions of Brazil. The presence of *Aichivirus C* in the samples was evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction assay. A 216-bp fragment of the *aichivirus* RNA-dependent RNA polymerase gene was amplified from 48 out of 63 (76.2 %) faecal samples. *Aichivirus C* was identified in all the evaluated regions, and variations in the frequency of virus detection among the different Brazilian regions were observed. *Aichivirus C* was detected at significantly higher rates in 2-week-old (18/20; 90.0 %) and 3-week-old (19/22; 86.4 %) piglets than in 1-week-old piglets (11/21; 52.4 %) ($P < 0.05$). The nucleotide sequences of three amplicons clustered together with other sequences previously isolated in Brazil, revealing that there were no phylogenetic differences in the strains of *Aichivirus C* by region or age. This study demonstrated that *Aichivirus C* has been present in Brazilian pig herds for years and has spread to the major pig-producing regions of the country.

Keywords *Picornaviridae* · Swine · Faeces · RT-PCR · *Aichivirus* RdRp gene · Emerging viruses

Introduction

The *Picornaviridae* family is divided into 17 genera and includes viruses of importance in human and animal health. The viruses of this family are small and non-enveloped and have a single-stranded positive-sense RNA (ssRNA) genome (ICTV 2012a).

Kobuviruses belong to the genus *Kobuvirus* and were first isolated from faecal samples of humans with acute gastroenteritis (Yamashita et al. 1991). Later, kobuvirus was isolated from different animal species, including cattle, pigs, sheep and bats (Yamashita et al. 2003; Reuter et al. 2008, 2010a; Reuter and Egyed 2009; Li et al. 2010; Barry et al. 2011).

Until 2012, the genus *Kobuvirus* officially included the species *Aichivirus*, which infects humans, and *Bovine kobuvirus*. The infection of pigs by a kobuvirus was first described by Reuter et al. (2008), and porcine kobuvirus was a candidate to be the third species in this genus (Reuter et al. 2011).

The representative species of the genus *Kobuvirus* have recently been renamed as *Aichivirus A* for human host species, *Aichivirus B* for bovine host species and *Aichivirus C* for porcine host species, which has been accepted as the third species in the genus (ICTV 2012b; c).

The genome length of kobuviruses is approximately 8.3 kb, and the ssRNA genome is organised into structural (VP0, VP3 and VP1) and non-structural (2A-2C and 3A-3D) regions and also includes a leader protein (L). The 3D gene region encodes a viral RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and represents a conserved region among kobuviruses (Reuter et al. 2011).

Aichivirus C has been reported in Hungary (Reuter et al. 2008, 2010b), Asian countries (Yu et al. 2009; Khamrin et al. 2009, 2010; Park et al. 2010), the Netherlands and Brazil (Barry et al. 2011). The presence of the virus has been evaluated primarily in faecal samples, but recent studies

J. Ribeiro · R. de Arruda Leme · A. F. Alfieri · A. A. Alfieri (✉)
Laboratory of Animal Virology, Department of Veterinary
Preventive Medicine, Universidade Estadual de Londrina,
Rodovia Celso Garcia Cid - Campus Universitário, PO Box 10011,
86057-970 Londrina, Paraná, Brazil
e-mail: alfieri@uel.br

have also detected *Aichivirus C* RNA in serum samples, indicating viraemia (Reuter et al. 2010b; Barry et al. 2011).

The pathogenesis of *Aichivirus C* is uncertain. Healthy and diarrhoeic individuals have been evaluated for the presence of the virus. Non-diarrhoeic faecal samples from suckling and weaned piglets up to finisher pigs from China, Korea and Hungary have been found to be positive for *Aichivirus C* with rates varying from 19.3 to 65.0 % (Yu et al. 2009; Reuter et al. 2009, 2010b; Park et al. 2010). However, the highest percentages (84.5 to 99.0 %) of positive results were detected in diarrhoeic piglets from Thailand, Korea and Japan (Khamrin et al. 2009; Park et al. 2010; Okitsu et al. 2012). Despite these reported results, it has not been confirmed that *Aichivirus C* causes enteric disease in pigs (Wang et al. 2012).

The first description of *Aichivirus C* infection in Brazil was recently published. In that study, the 3D region of the viral RdRp gene was detected in 78.4 % (29/37) and 41.0 % (32/78) of diarrhoeic and non-diarrhoeic faecal samples, respectively. Viraemia was also demonstrated. However, in that study, only one Brazilian pig herd was evaluated (Barry et al. 2011). The frequency of natural infection by *Aichivirus C* in different geographic regions of Brazil remains unknown.

The aim of this study was to evaluate the frequency of *Aichivirus C* infection in herds in seven states in the South, Southeast and Central-west regions of Brazil, which were responsible for 89.3 % of the total industrial pig meat produced in 2011 in Brazil (ABRPEC 2012). Suckling piglets were the target of this study because it has been demonstrated that the presence of the virus in faecal samples decreases with the age of the animals (Reuter et al. 2011).

Materials and methods

Sample collection

The samples were derived from a collection of piglet faeces collected from 2004 to 2011 and stored at 4 °C. The faecal samples were selected according to the state of origin and the age of the animals and analysed independent of other diagnostic results and the consistency of the faeces (diarrhoeic or not).

Porcine faecal samples from states within the three major industrial pig-producing regions of Brazil were selected. Nine piglet faecal samples from each of the following Brazilian states were analysed: Rio Grande do Sul, Santa Catarina and Paraná in the South region; São Paulo and Minas Gerais, representing the Southeast region; and Mato Grosso do Sul and Mato Grosso in the Central-west region.

When multiple faecal samples were selected from the same state, the samples were chosen according to the city. Samples from different cities in the same state were selected. When samples were from the same city in the same state,

they were selected from different farms where animals were raised. A total of 46 pig herds were included in this study.

Then, the faecal samples were chosen according to the age of the animals, and only faecal samples from suckling piglets were selected. A total of 63 faecal samples from piglets aged 1 to 3 weeks old were included in this study, 5 of which were of normal consistency and 58 ranging from pasty to liquid.

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

Virus detection

To determine whether the *Aichivirus C* was present, nucleic acids were extracted from 400 µl aliquots of faecal suspensions using a combination of the phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate nucleic acid extraction methods (Boom et al. 1990; Alfieri et al. 2006). The ssRNA was eluted in 50 µl of ultrapure RNase-free diethylpyrocarbonate-treated sterile water. Faecal samples previously confirmed by sequencing analysis to be positive for *Aichivirus C* (Barry et al. 2011) were included as positive controls, and sterile ultrapure water was used as a negative control in all the nucleic acid extraction and amplification procedures.

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed using the primers UNIV-kobu-F/R, which were designed based on human, bovine and porcine *aichivirus* strains and target a region of the RdRp gene (3D). A 216-bp amplicon was expected (Reuter et al. 2009). The amplified products were analysed by electrophoresis on a 2 % agarose gel in TBE buffer, pH 8.4 (89 mM Tris; 89 mM boric acid; 2 mM EDTA), which was stained with ethidium bromide (0.5 g/ml) and visualised under UV light.

To confirm the specificity of the amplicons obtained in this study, three *Aichivirus C*-positive samples from piglets aged 1 week (BRA 1044/2011), 2 weeks (BRA 748/2006) and 3 weeks (BRA 715/2006) and from different geographic regions were selected for sequencing and phylogenetic analysis. The amplicons were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), quantified with a Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA), and analysed by electrophoresis on a 2 % agarose gel. An ABI3500 Genetic Analyser and the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were used for sequencing, which was performed in both directions with forward and reverse primers. A phylogenetic tree constructed based on nucleotide (nt) sequences was obtained using the neighbour-joining method based on the Tamura–Nei model, which provided statistical support via bootstrapping with 1,000 replicates. The tree was constructed in MEGA package (version 5.0).

Statistical analysis

To analyse *Aichivirus C* infection in pigs of the different ages, the piglet faecal samples were divided according to the age of the animals into groups of 1-week-old ($n=21$), 2-week-old ($n=20$) and 3-week-old ($n=22$) animals. Statistical analysis was performed with Epi Info™ to compare the proportions of *Aichivirus C*-positive samples among the three regions evaluated and the three age groups. The analysis was performed using the chi-square (χ^2) test or Fisher's exact test. The confidence limit for the statistical tests was set at 95 % ($P<0.05$).

Results

Aichivirus C was detected in faecal samples from 37 (80.4 %) of the 46 pig herds included in this study, and positive samples were found in all of the states evaluated in the three Brazilian geographical regions. Among the 63 piglet faecal samples analysed, 48 (76.2 %) were positive for *Aichivirus C* RNA (Table 1). According to the consistency, *Aichivirus C* was detected in 4 of the 5 normal and in 44 of the 58 diarrhoeic piglet faecal samples, respectively.

The comparison of the proportions of positive samples among the three regions showed that the Southeast region had a significant ($P=0.005$) higher rate of *Aichivirus C* detection than the Central-west region. No significant ($P>0.05$) differences were found between the South and Southeast regions and the South and Central-west regions.

The rates of *Aichivirus C* detection according to the age of the piglets were 52.4 % (11/21), 90 % (18/20) and 86.4 % (19/22) for animals at 1, 2 and 3 weeks old, respectively. *Aichivirus C* was detected at significant higher rates in piglets of 2 weeks ($P=0.008$) and 3 weeks ($P=0.015$) of age compared with 1-week-old piglets (Table 2).

Table 1 Detection of *Aichivirus C* RNA by RT-PCR in faecal samples from suckling piglet belonging to pig herds located in seven different states in Brazil

Region	State	Samples positive/tested (%)	Total (%)
South	RS	7/9 (77.8)	20/27 (74) a
	SC	6/9 (66.7)	
	PR	7/9 (77.8)	
Southeast	SP	9/9 (100)	18/18 (100) a, b
	MG	9/9 (100)	
Central-west	MS	7/9 (77.8)	10/18 (55.6) a, c
	MT	3/9 (33.3)	

Different letters denote significant differences ($P<0.05$)

RS Rio Grande do Sul, SC Santa Catarina, PR Paraná, SP São Paulo, MG Minas Gerais, MS Mato Grosso do Sul, MT Mato Grosso

Table 2 Frequency of *Aichivirus C* detection by RT-PCR according to the age of the piglets

<i>Aichivirus C</i>	Age (weeks)		
	One (%)	Two (%)	Three (%)
Positive	11 (52.4) a	18 (90) b	19 (86.4) b
Negative	10 (47.6)	2 (10)	3 (13.6)
Total	21 (100)	20 (100)	22 (100)

Different letters denote significant differences ($P<0.05$)

The sequence analysis confirmed that the amplicons obtained were from *Aichivirus C*. The nt sequences of three amplicons clustered together with other strains isolated previously in Brazil (Fig. 1).

Discussion

The three geographical regions included in this study are responsible for the majority of industrially produced pork meat in Brazil. *Aichivirus C* infection was present in all of these regions, suggesting that the virus is widespread in Brazilian pig herds. The percentages of positive results obtained in this study are in agreement with the results of a previous Brazilian study that evaluated only one farm and detected *Aichivirus C* in 87.5 % (56/64) of faecal samples from piglets aged 4 to 21 days old (Barry et al. 2011).

The detection of *Aichivirus C* from a high number of pig herds supports the hypothesis that the virus is widely disseminated in Brazil. Despite the negative results in 19.6 % (9/46) of the pig herds, it cannot be ruled out that *Aichivirus C* is present in these farms because a small number of faecal samples per herd were evaluated in this study.

In this study, lower rates of *Aichivirus C* detection were observed in the Central-west Brazilian region, specifically in the Mato Grosso state. These data reveal that although *Aichivirus C* infection is not geographically restricted, variations in the frequencies of infection may be present between different geographical areas of the same country.

The frequency of *Aichivirus C* infection in suckling piglets of different ages was also evaluated, and the results presented herein show that the frequency of viral infection increased with the age of the piglets. Based on these results, it is possible that the level of *Aichivirus C* shedding in 1-week-old piglets is lower because the virus is most likely in the initial stages of infection and because viral shedding increases with increased *Aichivirus C* replication.

Barry et al. (2011) in Brazil have reported lower percentages of *Aichivirus C*-positive faecal samples for piglets between 28 and 60 days old compared with animals up to 21 days old. In the present study, 3-week-old piglets had a lower percentage of

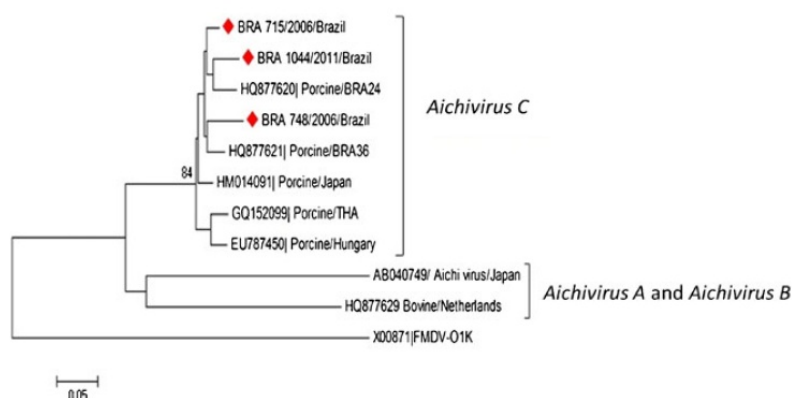


Fig. 1 Neighbour-joining phylogenetic tree (Tamura–Nei model) constructed based on 170 nt partial *Aichivirus C* RdRp gene. The tree includes BRA 1044/2011 (JX422219)–BRA 748/2006 (JX422220)–BRA 715/2006 (JX422221) (red filled diamond), sequences described in Brazil

(HQ877620–HQ877621) and others obtained from GenBank (HM014091/ Japan–GQ152099/Thailand–EU787450/Hungary). *Aichivirus A*, *Aichivirus B* and foot-and-mouth disease virus were included as out group. Bootstrap values (1,000 replicates) higher than 70 % are shown

samples positive for *Aichivirus C*. Although this difference was slight and not significant ($P > 0.05$), it may be indicative of a decrease in the frequency of infection with the age of the animals. The high frequency of natural infection by *Aichivirus C* in suckling piglets indicates that these animals had early contact with the virus, which raises questions regarding the routes of the viral transmission.

Based on studies on *Aichivirus A*, it is assumed that kobuviruses are transmitted primarily by the faecal–oral route, either directly from person-to-person, or indirectly via contaminated food or water (Reuter et al. 2011). However, based on the results for *Aichivirus* infection obtained from piglets and sows, it has been suggested that the faecal–oral route may not be the only mode of viral transmission from mother to piglets in early life (Barry et al. 2011). The significant increase in the frequency of *Aichivirus C* infection in the three age groups observed in this study suggests that, in addition to the potential sow-to-piglet transmission route, piglet-to-piglet viral dissemination is also likely.

Alternative routes of kobuviruses infection have been suggested, such as transmission via milk, blood (handling procedures), urine, saliva or even aerosols, as for other picornaviruses (Reuter et al. 2010b; Barry et al. 2011). Kobuviruses have been suggested not to be species-specific but may be well adapted to their hosts (Barry et al. 2011). The possibility of interspecies or zoonotic transmission requires further investigation (Reuter et al. 2011).

Studies have evaluated whether *Aichivirus C* may be a causative agent of porcine enteric diseases. Despite that higher frequencies of *Aichivirus C* have been reported from diarrhoeic than from normal consistency pig faecal samples (Khamrin et al. 2009; Park et al. 2010; Okitsu et al. 2012), the association of the virus presence and disease has not been conclusive. In the present study, such evaluation is unviable

due to the small number of faecal samples of normal consistency relative to the diarrhoeic, which could be a bias in the statistical analysis. Furthermore, a causal relationship could be established only if the infections with other porcine enteric viruses (rotaviruses, caliciviruses and picobirnaviruses) were tested and not present.

The faecal samples analysed in this study were collected between 2004 and 2011, and positive results for *Aichivirus C* were observed throughout this time interval. Therefore, these data represent a retrospective study of 7 years and show that the introduction of the virus into pig herds in Brazil is not recent.

The sequences analysed form a well-defined cluster within *Aichivirus C*. Based on these observations, it can be concluded that the *Aichivirus C* strains in this study are very similar to each other and do not seem to group according to geographical region or age, in agreement with previously presented results (Barry et al. 2011).

There are a large number of viruses responsible for enteric diseases in pigs, and the description of new viruses makes this number increase. Emerging viral infections of the porcine gastrointestinal tract have been reported, such as infections by porcine caliciviruses (sapovirus and norovirus), kobuviruses and toroviruses, and although the associations between these viruses and specific clinical symptoms have not been confirmed, these viruses are considered endemic in some geographic areas of many countries (Kroneman et al. 1998; Pignatelli et al. 2010; Reuter et al. 2011; Meng 2012).

In Brazil, porcine pathogenic enteric viruses (rotaviruses A, B and C) and emerging viral agents (*Aichivirus C*, porcine caliciviruses, hepatitis E virus and torque teno sus virus) are widespread in the pig herds (Barry et al. 2008, 2011; Cunha et al. 2010; Médici et al. 2011; Gardinali et al. 2012; de Arruda Leme et al. 2012). The surveillance of enteric viral infections,

emerging or not, deserves continuous attention because the maintenance of pig intestinal health is one of the essential factors in ensuring productivity. Moreover, pig waste can be responsible for water and environmental contamination, and because of the zoonotic potential of some of these viruses is not known, this contamination cannot be ignored.

To the best of our knowledge, this study represents the first description of *Aichivirus C* in suckling piglets from states that represent the major pig-producing regions of Brazil and is the first Brazilian retrospective evaluation of *Aichivirus C* infection. The results show that infection by *Aichivirus C* has been disseminating among Brazilian pig herds for years (2004–2011). The presence of *Aichivirus C* in faecal samples from suckling piglets revealed that the piglets are infected early in life and that these animals can spread the virus, even during the suckling period. Few studies have discussed the epidemiological features of *Aichivirus C* infection. The present results provide useful data for improving the knowledge on the global distribution of this virus. Other studies that aim to better understand the biological properties of this virus may help to elucidate the evolution, epidemiology, infection dynamics, pathogenicity and sanitary risks of *Aichivirus C*.

Acknowledgments We would like to 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 Araucária Foundation (FAP/PR). Alfieri, A.A. and Alfieri, A.F. are recipients of CNPq fellowships.

References

- ABIPECS – Brazilian Pork Industry and Exporter Association <www.abipecs.org.br/uploads/relatorios/mercado_interno/producao/producao2011.pdf> Accessed in: 03 Nov 2012
- Alfieri, A.A., Parazzi, M.E., Takiuchi, E., Médici, K.C. and Alfieri, A.F., 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002, *Tropical Animal Health and Production*, 38, 521–526
- Barry, A.F., Alfieri, A.F. and Alfieri, A.A., 2008. Detection and phylogenetic analysis of porcine enteric calicivirus, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III, in Brazilian swine herds, *Brazilian Journal of Veterinary Research*, 28, 82–86
- Barry, A.F., Ribeiro, J., Alfieri, A.F., van der Poel, W.H. and Alfieri, A.A., 2011. First detection of kobuvirus in farm animals in Brazil and the Netherlands, *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1811–1814
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M. and van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 495–503
- Cunha, J.B., de Mendonça, M.C., Miagostovich, M.P. and Leite, J.P., 2010. Genetic diversity of porcine enteric caliciviruses in pigs raised in Rio de Janeiro State, Brazil, *Archives of Virology*, 155, 1301–1305
- de Arruda Leme, R., Alfieri, A.F. and Alfieri, A.A., 2012. Torque teno sus virus infection in suckling piglets from Brazilian pig herds, *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1885–1890
- Gardinali, N.R., Barry, A.F., da Silva, P.F., de Souza, C., Alfieri, A.F. and Alfieri, A.A., 2012. Molecular detection and characterization of hepatitis E virus in naturally infected pigs from Brazilian herds, *Research in Veterinary Science*, 93, 1515–1519
- ICTVa – International Committee on Taxonomy of Viruses <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>> Accessed in: 03 Nov 2012
- ICTVb – International Committee on Taxonomy of Viruses. Change the names of species *Aichi virus* and *Bovine kobuvirus* (family *Picornaviridae*, genus *Kobuvirus*) to *Aichivirus A* and *Aichivirus B*, respectively. <<http://ictvonline.org/proposals/2012.014aV.A.v1.Kobuvirus-Sp.Ren.pdf>> Accessed in: 17 May 2013
- ICTVc – International Committee on Taxonomy of Viruses. Create species *Aichivirus C* in the genus *Kobuvirus*, family *Picornaviridae*, order *Picornavirales*. <<http://ictvonline.org/proposals/2011.020aV.A.v2.Kobuvirus-Sp.pdf>> Accessed in: 17 May 2013
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Kongkaew, A., Kongkaew, S., Okitsu, S. and Ushijima, H., 2009. Porcine kobuvirus in piglets, Thailand, *Emerging Infectious Diseases*, 15, 2075–2076
- Khamrin, P., Maneekarn, N., Hidaka, S., Kishikawa, S., Ushijima, K., Okitsu, S. and Ushijima, H., 2010. Molecular detection of kobuvirus sequences in stool samples collected from healthy pigs in Japan, *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 950–954
- Kroneman, A., Cornelissen, L.A.H.M., Horzinek, M.C., de Groot, R.J. and Egberink, H.F., 1998. Identification and Characterization of a Porcine Torovirus, *Journal of Virology*, 72, 3507–3511
- Li, L., Victoria, J.G., Wang, C., Jones, M., Fellers, G.M., Kunz, T.H. and Delwart, E., 2010. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses, *Journal of Virology*, 84, 6955–6965
- Médici, K.C., Barry, A.F., Alfieri, A.F. and Alfieri, A.A., 2011. Porcine rotavirus groups A, B, and C identified in polymerase chain reaction in a fecal sample collection with inconclusive results by polyacrylamide gel electrophoresis, *Journal of Swine Health and Production*, 19, 146–150
- Meng, X.J., 2012. Emerging and Re-emerging Swine Viruses, *Transboundary and Emerging Diseases*, 59, 85–102
- Okitsu, S., Khamrin, P., Thongprachum, A., Hidaka, S., Kongkaew, S., Kongkaew, A., Maneekarn, N., Mizuguchi, M., Hayakawa, S. and Ushijima, H., 2012. Sequence analysis of porcine kobuvirus VP1 region detected in pigs in Japan and Thailand, *Virus Genes*, 44, 253–257
- Park, S.J., Kim, H.K., Moon, H.J., Song, D.S., Rho, S.M., Han, J.Y., Nguyen, V.G. and Park, B.K., 2010. Molecular detection of porcine kobuviruses in pigs in Korea and their association with diarrhea, *Archives of Virology*, 155, 1803–1811
- Pignatelli, J., Grau-Roma, L., Jiménez, M., Segalés, J. and Rodríguez, D., 2010. Longitudinal serological and virological study on porcine torovirus (PToV) in piglets from Spanish farms, *Veterinary Microbiology*, 146, 260–268
- Reuter, G., Boldizsár, A., Kiss, I. and Pankovics, P., 2008. Candidate new species of Kobuvirus in porcine hosts, *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1968–1970
- Reuter, G., Boldizsár, Á. and Pankovics, P., 2009. Complete nucleotide and amino acid sequences and genetic organization of porcine kobuvirus, a member of a new species in the genus *Kobuvirus*, family *Picornaviridae*, *Archives of Virology*, 154, 101–108
- Reuter, G. and Egyed, L., 2009b. Bovine kobuvirus in Europe, *Emerging Infectious Diseases*, 15, 822–823
- Reuter, G., Boros, A., Pankovics, P. and Egyed, L., 2010a. Kobuvirus in domestic sheep, Hungary, *Emerging Infectious Diseases*, 16, 869–870
- Reuter, G., Kecskémeti, S. and Pankovics, P., 2010b. Evolution of porcine kobuvirus infection, Hungary, *Emerging Infectious Diseases*, 16, 696–698
- Reuter, G., Boros, Á. and Pankovics, P., 2011. Kobuviruses – a comprehensive review, *Reviews in Medical Virology*, 21, 32–41

- Wang, C., Lan, D., Cui, L., Yang, Z., Yuan, C. and Hua, X., 2012. Molecular characterization of a porcine kobuvirus strain in China, *Archives of Virology*, 157, 573–578
- Yamashita, T., Kobayashi, S., Sakae, K., Nakata, S., Chiba, S., Ishihara, Y. and Isomura, S., 1991. Isolation of Cytopathic Small Round Viruses with BS-C-1 Cells from Patients with Gastroenteritis, *Journal of Infectious Diseases*, 164, 954–957
- Yamashita, T., Ito, M., Kabashima, Y., Tsuzuki, H., Fujiura, A. and Sakae, K., 2003. Isolation and characterization of a new species of kobuvirus associated with cattle, *Journal of General Virology*, 84, 3069–3077
- Yu, J.M., Jin, M., Zhang, Q., Li, H.Y., Li, D.D., Xu, Z.Q., Li, J.S., Cui, S.X., Yang, S.H., Liu, N. and Duan, Z.J., 2009. Candidate porcine Kobuvirus, China, *Emerging Infectious Diseases*, 15, 823–825

CONCLUSÕES

- A RT-PCR possibilitou a amplificação de um segmento com 216 pb do gene RdRp de *Aichivirus B* e *C* em 18,2% e 76,2% das amostras de fezes de bovinos e suínos, respectivamente, incluídas no estudo;
- *Aichivirus B* e *C* foram identificados em rebanhos de todas as regiões geográficas brasileiras analisadas demonstrando a ampla distribuição da infecção por esses vírus nos rebanhos bovinos e suínos, respectivamente;
- A taxa de infecção por *Aichivirus B* foi significativamente ($P \leq 0,05$) maior em bezerros com quadro clínico de diarreia quando comparada com a taxa de infecção de bovinos adultos com diarreia;
- A taxa de detecção do *Aichivirus B* foi maior nos rebanhos de produção leiteira (22,2%) em relação aos rebanhos de corte (13,3%) avaliados;
- O estudo demonstrou alta taxa de infecção por *Aichivirus C* em leitões lactentes de todas as regiões incluídas no estudo;
- A análise das sequências nucleotídeos confirmou a presença do *Aichivirus B* e *C* nos rebanhos bovinos e suínos, respectivamente;
- Por meio da análise filogenética foi possível concluir que as cepas de *Aichivirus B* obtidas neste estudo, formaram um ramo distinto na árvore filogenética quando comparadas com as cepas identificadas em outros países. No entanto, as cepas de *Aichivirus C* pertencentes a este estudo, agruparam-se com outras cepas brasileiras descritas em estudos realizados anteriormente.

ANEXOS

ANEXO A

Deteção de *Aichivirus B* em amostras de fezes de bovinos pela técnica de RT-PCR

País	Idade	Consistência	Nº Amostras		Prevalência em idade (%)	Referência
			Avaliadas	Positivas (%)		
Japão	2-4 anos	Normal	72	12 (16,7)	-	Yamashita et al., 2003
Tailândia	7-49 dias	Diarreia	72	6 (8,3)	-	Khamrin et al., 2008
Hungria	1-9 dias	Normal	32	2 (6,25)	-	Reuter et al., 2009
	14-17 dias				-	
	6-7 meses				6,25	
	1-7 anos				-	
< 20 dias	-					
Coreia do Sul	≤ 30 dias	Normal (21)	107	5 (23,8)	-	Jeoung et al., 2011
	>30 dias	Diarreia (86)		32 (37,2)		
Holanda	12-14 dias	Normal	9	7 (77,8)	-	Barry et al., 2011
Coreia do Sul	≤ 6 meses	Diarreia	62	16 (25,8)	66,7	Park et al., 2011
	≤ 1 ano				25,0	
	> 1 ano				18,4	
Itália	≤ 6 semanas	Diarreia (38)	142	2 (5,3)	-	Di Martino et al., 2012
		Normal (104)		5 (4,8)		

ANEXO B

Detecção de *Aichivirus C* em amostras de fezes de suínos pela técnica de RT-PCR

País	Idade	Consistência	Nº Amostras		Prevalência em idade (%)	Referência
			Avaliadas	Positivas (%)		
Hungria	<10 dias	Normal	15	15 (100)	-	Reuter et al., 2008
Hungria	10 dias	Normal	60	39 (65)	100	Reuter et al., 2009
	3 semanas				93,3	
	3 meses				20,0	
	6 meses				46,7	
Japão	7-49 dias	Diarreia	98	97 (99)	-	Khamrin et al., 2009
China	<15 dias	Normal	322	97 (30)	-	Yu et al., 2009
Coreia do Sul	≤ 3 semanas	Normal (83) Diarreia (83)	167	16 (19,3) 71 (84,5)	83,6	Park et al., 2010
	≤ 6 meses				57,6	
	≤ 22 semanas				27,5	
	≥ 1 ano				18,2	
Japão	≤ 6 meses	Normal	293	133 (45,4)	49,8	Khamrin et al., 2010
	> 6 meses				20,5	
Coreia do Sul	≥ 3 semanas	Normal (33) Diarreia (86)	119	15 (45,5) 28 (32,6)	60	An et al., 2011
	Terminação				11,9	
Brasil	4-21 dias	Normal (78) Diarreia (37)	115	32 (41) 29 (78,4)	87,5	Barry et al., 2011
	28-60 dias				8,8	
	> 1 ano				11,8	
Tailândia	4 semanas	Diarreia	131	127 (97,0)	-	Okitsu et al., 2012
República Checa	< 4 semanas	Normal	196	175 (87,3)	90,9	Dufkova et al., 2013
	4-12 semanas				100	
	Porcas				90,9	
	6 meses				68,6	
Estados Unidos	4 semanas	Diarreia (114) Normal (46)	160	25 (21,9) 10 (21,7)	68	Verma et al., 2013
	8 semanas				20	
	9 semanas				9	

ANEXO C

Comparação de similaridade de nucleotídeos da região RdRp do *Aichivirus B* entre estirpes pertencentes ao Brasil com estirpes de outros países.

	BRA09	BRA55	BRA1682	JQ900629 Italy	JQ900632 Italy	HQ877629 Netherlands	HQ877630 Netherlands	EF659450 Thailand	EF659451 Japan	EF659454 Japan	HQ650177 Corea	DQ028632 Aichi	HQ650196 Corea	HQ650172 Corea
BRA09	ID	0,935	0,901	0,911	0,911	0,911	0,901	0,911	0,911	0,906	0,921	0,674	0,926	0,916
BRA55	0,935	ID	0,94	0,916	0,916	0,916	0,886	0,945	0,945	0,945	0,916	0,669	0,916	0,911
BRA1682	0,901	0,94	ID	0,916	0,896	0,906	0,886	0,926	0,926	0,921	0,876	0,655	0,886	0,871
JQ900629 Italy	0,911	0,916	0,916	ID	0,931	0,931	0,931	0,95	0,95	0,945	0,921	0,674	0,931	0,916
JQ900632 Italy	0,911	0,916	0,896	0,931	ID	0,931	0,911	0,95	0,95	0,945	0,906	0,665	0,916	0,901
HQ877629 Netherlands	0,911	0,916	0,906	0,931	0,931	ID	0,931	0,931	0,931	0,926	0,931	0,655	0,931	0,926
HQ877630 Netherlands	0,901	0,886	0,886	0,931	0,911	0,931	ID	0,911	0,911	0,906	0,921	0,674	0,931	0,916
EF659450 Thailand	0,911	0,945	0,926	0,95	0,95	0,931	0,911	ID	1,000	0,995	0,916	0,684	0,926	0,911
EF659451 Japan	0,911	0,945	0,926	0,95	0,95	0,931	0,911	1,000	ID	0,995	0,916	0,684	0,926	0,911
EF659454 Japan	0,906	0,945	0,921	0,945	0,945	0,926	0,906	0,995	0,995	ID	0,911	0,679	0,921	0,906
HQ650177 Corea	0,921	0,916	0,876	0,921	0,906	0,931	0,921	0,916	0,916	0,911	ID	0,679	0,99	0,995
DQ028632 Aichi virus/Goiania	0,674	0,669	0,655	0,674	0,665	0,655	0,674	0,684	0,684	0,679	0,679	ID	0,674	0,674
HQ650196 Corea	0,926	0,916	0,886	0,931	0,916	0,931	0,931	0,926	0,926	0,921	0,99	0,674	ID	0,985
HQ650172 Corea	0,916	0,911	0,871	0,916	0,901	0,926	0,916	0,911	0,911	0,906	0,995	0,674	0,985	ID

APENDICES

APÊNDICE A

Lista de Reagentes

- 1 100 mM dNTP *Set*, 4 x 250 µL; 25 µmol cada (100 mM dATP *Solution*, 100 mM dCTP *Solution*, 100 mM dGTP *Solution*, 100 mM dTTP *Solution*) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
- 2 10 x PCR-*Buffer* (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl) (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
- 3 123 bp DNA *Ladder* (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
- 4 Acetona P.A. (CH₃COCH₃) P.M. 58,08 (Dinâmica®)
- 5 Ácido bórico (H₃BO₃) P.M. 61,83 (Sicalab®)
- 6 Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen®)
- 7 Ácido etilenodiaminotetraácido sal di-sódico - EDTA P.A. (C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O) P.M. 372,24 (Reagen®)
- 8 Agarose (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
- 9 Álcool etílico absoluto (C₂H₅OH) P.M. 46,07 (Nuclear®)
- 10 Álcool isoamílico ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH) P.M. 88,15 (Synth®)
- 11 Azul de bromofenol (Sigma®, EUA)
- 12 Brometo de etídeo (C₂₁H₂₀N₃Br) P.M. 394,3 (Sigma®, EUA)
- 13 Clorofórmio P.A. (CHCl₃) P.M. 119,38 (Dinâmica®)
- 14 Dióxido de sílica (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®, EUA)
- 15 Dodecil Sulfato de Sódio - Lauril Sulfato de Sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S) P.M. 288,38 (BDH)
- 16 Hidróxido de Sódio P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (*Mallinckrodt Chemicals*®)
- 17 Hidroximetil amino metano - TRIS 99% P.M. 121,14 (Merck)
- 18 Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (*Invitrogen™ Life Technologies, EUA*)
- 19 *Platinum Taq DNA Polymerase recombinant* 500 unidades (*Invitrogen™ Life Technologies, BRA*)
- 20 Sacarose, P.A. - sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen®)
- 21 Triton x-100 (J.T.Baker®)
- 22 Fenol (C₆H₅OH) P.M. 94,11 (*Invitrogen Life Technologies™*)M-MLV Reverse Transcriptase - 200 units/µL (*Invitrogen Life Technologies*®)
- 23 Água DEPEC (Dietil pirocarbonato) (*Invitrogen Life Technologies*®)
- 24 Glicina P.A. P.M. 75,07 (Nuclear®)

- 25 Cloreto de magnésio 50 mM (MgCl_2) (Invitrogen Life Technologies®)
- 26 Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen®)
- 27 Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen®)
- 28 Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) UNIV-R - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®)
- 29 Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) UNIV-F - 200 pmol (Invitrogen Life Technologies®)

APÊNDICE B

Soluções e Tampões

• Diluição do primer

Primer UNIV forward

- Sequência: 5'-TGGAYTACAAG(/R)ATGTTTTGATGC-3'
- Local de amplificação: gene RdRp
- Concentração: 15,6 nmol
 $15,6 \times 1000 = 15600 \text{ pmol}$
 $15600/20 = 780$
- Solução estoque: ressuspender 780 μL em água de ultrapura autoclavada para a obtenção da solução 10x []
- Solução uso: diluir 1:10 a solução estoque em água de ultrapura
- Solução final: 20 pmol/ μL

Primer UNIV reverse

- Sequência: 5'- TGTTGTTRATGATGGTGTGA-3'
- Local de amplificação: gene RdRp
- Concentração: 36,7 nmol
 $36,7 \times 1000 = 36700 \text{ pmol}$
 $36700/20 = 1835$
- Solução estoque: ressuspender em 1835 μL água de ultrapura autoclavada para a obtenção da solução 10x []
- Solução uso: diluir 1:10 a solução estoque em água de ultrapura
- Solução final: 20 pmol/ μL

• Hidratação da sílica

- 60 g de sílica (O_2Si)
- Adicionar 500 mL de água ultrapura autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 horas
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante

- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 horas para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 μ L de HCl (32% w/v) para ajustar o pH=2,0) - aliquotar e autoclavar

- **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 g de Triton x-100

- **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**

- 0,25 g azul de bromofenol (0,25%)
 - 45 g sacarose - sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) (45%)
- Água MilliQ (q.s.p.) 100 mL

- **Fenol/clorofórmio-álcool isoamílico**

- 25 mL fenol saturado
- 24 mL clorofórmio
- 1 mL álcool isoamílico

- **SDS 10%**

- 5 g de dodecil sulfato de sódio - Lauril sulfato de sódio - SDS (C₁₂H₂₅NaO₄S)
- Água ultrapura autoclavada (q.s.p.) 50 mL

- **Gel de agarose 2%**

- 1 g agarose
- 50 mL de tampão TEB 1x
- 30 μ L de brometo de etídio

- **Diluição de dNTP**

- solução estoque - concentração 100 mM - 100 μ L de cada dNTP
- solução uso - concentração 10 mM - 10 μ L da solução estoque + 90 μ l de água ultrapura autoclavada

APÊNDICE C

Protocolo de Técnicas

- **Suspensão fecal - Extração bruta**

- Pesar 1 g do material fecal em balança de precisão
- Adicionar 9 mL de tampão TRIS/Ca⁺⁺ 1x (para amostra líquidas estabelecer a proporção 1:2)
- Homogeneizar
- Calibrar os tubos
- Centrifugar 2.000 x g / 5 min
- Recolher sobrenadante
- Identificar e estocar em frascos a 4°C

- **Extração do RNA: Associação das técnicas fenol/clorofórmio-álcool isoamílico e sílica/isotiocianato de guanidina**

- Aliquotar 500 µL da suspensão fecal
- Adicionar 50 µL de SDS 10 %
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C /20 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 500 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria 56 °C /15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar 10.000 x g /10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo
- Adicionar 500 µL da solução L6
- Adicionar 25 µL de sílica hidratada
- Homogeneizar em vórtex
- 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 vórtex
 - Centrifugar 10.000 x g /30 s
 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10 M
 - Adicionar 500 μL de solução L2
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar 10.000 x g /30 s
 - Desprezar o sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 500 μL de etanol 70% gelado
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar 10.000 x g /30 s
 - Desprezar sobrenadante em descarte comum
 - Adicionar 500 μL de etanol 70% gelado
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar 10.000 x g /30 s
 - Desprezar sobrenadante em descarte comum
 - Adicionar 1000 μL de acetona P.A. gelada
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar 10.000 x g /30 s
 - Desprezar sobrenadante em descarte comum
 - Secar o *pellet* em termo bloco à 60°C (aproximadamente 2 min) ou banho-maria à 56°C (15 min)
 - Adicionar 50 μL de água DEPEC
 - Homogeneizar em vórtex
 - Banho-maria 56°C/15 min
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar 13.000 x g / 4 min
 - Recolher o sobrenadante em microtubo de 500 μL
- Estocar à 4°C ou -20°C até a utilização

- **RT-MIX (para uma reação)**

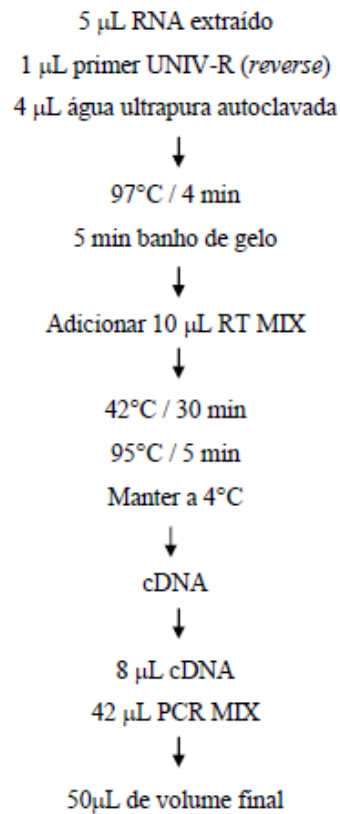
- Buffer 5x [Tris-HCl250 mM (pH 8.3); KCl375 mM; MgCl₂ 15 mM]: 4,0 μL

- DTT (0,1 M): 2,0 μ L
- dNTP (0,1 mM): 1,0 μ L
- M-MLV (200 U/ \square L): 0,5 μ L
- Água: 2,5 μ L

- **PCR-MIX (para uma reação)**

- Buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 7,5 μ L
- MgCl₂ (50 mM): 2,0 μ L
- dNTP (0,1 mM): 4,0 μ L
- UNIV- F (20 pmol): 1,0 μ L
- UNIV-R (20 pmol): 1,0 μ L
- Platinum®*Taq* DNA Polymerase (5 U/ μ L): 0,5 μ L
- Água: 26,0 μ L

- **RT-PCR**



94°C / 3 min

40 ciclos (94°C / 30 s; 51°C / 1 min 20 s; 72°C / 1 min) e um ciclo final de 72°C / 10 min

- **Eletroforese (Gel de agarose a 2%)**

- 1 g de agarose
- 50 mL TBE *buffer* (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8.4
- 20 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

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

- Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL
- Adicionar 10 µL do *Capture buffer type 2* para cada 10 mg de Del
- Incubar o tubo a 60°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min
- *Spin*
- Transferir 600µL da amostra com o *Capture buffer type 2* em um microtubo coletor com coluna
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min
- Centrifugar a 13 000 g / 2 min
- Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo microtubo
- Adicionar 500 µL do *Wash buffer type 1* na coluna com microtubo coletor
- Centrifugar a 13 000 g / 1 min
- Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL
- Adicionar 30 µL do *Elution buffer type 6*
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min
- Centrifugar a 13 000 g / 1 min
- Estocar o DNA purificado em -20°C

- **Quantificação de produto de PCR**

- Preparar a solução *Quant-iT™ Working Solution* diluindo o reagente *Quant-iT™* no *Quant-iT™ Buffer*, 1:200. São necessários 200 µL desta solução por amostra e para os padrões 0 e 100.
- Homogeneizar em vórtex
- No microbuto das amostras adicionar 198 µL da solução *Quant-iT™ Working Solution 2* a 2 µL do DNA purificado

- No microtubo do padrão 0 adicionar 190 μ L da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μ L do padrão 0
- No microtubo do padrão 100 adicionar 190 μ L da solução *Quant-iTTM Working Solution* a 10 μ L do padrão 100
- Homogeneizar os microtubos em vórtex por 2 – 3 s
- Incubar os microtubos em temperatura ambiente por 2 min
- Realizar a leitura utilizando *QubitTM fluorometer* (Invitrogen Life TechnologiesTM)
- Multiplicar pelo fator de diluição para determinar a concentração correta da amostra

APÊNDICE D

Lista de Software

- 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 package software version 5.10
(<http://www.megasoftware.net/mega5/mega51.html>)
- BioEdit software version 7.0.5.3
(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)