



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ALINE FERNANDES BARRY

**FREQÜÊNCIA DE DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO CALICIVÍRUS ENTÉRICO SUÍNO
EM REBANHOS BRASILEIROS**

Londrina
2007

ALINE FERNANDES BARRY

**FREQÜÊNCIA DE DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO CALICIVÍRUS ENTÉRICO SUÍNO
EM REBANHOS BRASILEIROS**

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

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri

Londrina
2007

Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

B279f Barry, Aline Fernandes.

Frequência de diagnóstico e caracterização molecular do calicivírus entérico suíno em rebanhos brasileiros / Aline Fernandes Barry. – Londrina, 2007.
74f. : 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, 2007.

Inclui bibliografia.

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

CDU 619:636.4

ALINE FERNANDES BARRY

**FREQÜÊNCIA DE DIAGNÓSTICO E CARACTERIZAÇÃO
MOLECULAR DO CALICIVÍRUS ENTÉRICO SUÍNO
EM REBANHOS BRASILEIROS**

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Paulo Gagliardi Leite
Departamento de Virologia/FIOCRUZ

Prof^ª. Dra. Marilda Carlos Vidotto
DMVP / CCA / UEL

Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri
DMVP / CCA / UEL

Londrina, 22 de março de 2007.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial 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

Ao professor e orientador Dr. Amauri Alcindo Alfieri pelos ensinamentos, orientação e paciência durante a realização desse trabalho.

Aos professores que constituíram a banca de qualificação Dr. João Luis Garcia e Dra. Alice Fernandes Alfieri pelas sugestões e contribuições ao nosso trabalho. Ao Dr. José Paulo Gagliardi Leite e Dra. Marilda Carlos Vidotto pela participação na banca de defesa. À Dra. Roberta Lemos Freire pela ajuda e disponibilidade.

Aos médicos veterinários da divisão de suínos que compõe o corpo técnico da Intervet pela colheita das amostras de fezes de leitões analisadas nesse experimento.

Às técnicas do laboratório de virologia Kerlei, Dalíria e Maria pela paciência, ensinamentos e grande ajuda durante esses anos.

Aos novos amigos e colegas do laboratório de virologia e da UEL pela amizade, companhia e grande receptividade desde o primeiro dia de convivência. Em especial às amigas de biologia molecular Michele, Betinha e Marlise e a grande amiga Luciana.

À minha mãe pela enorme generosidade, carinho e atenção; ao meu pai pelo incentivo e orientação nessa longa jornada que escolhi traçar; ao meu irmão pelas conversas e risadas durante várias madrugadas de trabalho no computador e à minha irmã pelo apoio e admiração. À todos vocês **muito obrigada**, e apesar da distância a existência de vocês sempre foi minha principal motivação.

Por último, mas principalmente, ao meu noivo pela paciência, cumplicidade e dedicação em mais essa etapa de nossas vidas.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

OBRIGADA

“A educação de um povo se avalia pelo modo como trata os animais”

Alexander von Humboldt

BARRY, A.F. **Frequência de diagnóstico e caracterização molecular do calicivírus entérico suíno em rebanhos brasileiros.** 2007. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007.

RESUMO

Os membros do gênero *Sapovirus* (SaV) são divididos em cinco genogrupos com base na similaridade do gene da proteína principal do capsídeo. Estirpes de quatro desses genogrupos podem ocasionar diarreia em seres humanos e apenas o genogrupo III (GIII) é relacionado à infecções entéricas em suínos. O protótipo do GIII é a estirpe Cowden, que é a única estirpe de SaV adaptada em cultivo celular. Os calicivírus entéricos suínos foram descritos em poucos países, e embora a frequência da infecção seja variável, é considerado um importante agente etiológico de diarreia. O objetivo desse estudo foi detectar o SaV em fezes diarreicas e não-diarreicas de leitões e correlacionar a presença do vírus com sinais clínicos de diarreia e faixa etária dos animais infectados, além de observar a taxa de ocorrência e analisar filogeneticamente uma estirpe representante de cada Estado incluído neste estudo. Foram testadas 113 amostras de fezes de leitões com idade de um a 28 dias, provenientes de rebanhos dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, durante os anos de 2004 e 2005. Foi utilizada a técnica da RT-PCR com os primers p289/290 desenvolvidos para amplificar uma região do gene da polimerase viral. O fragmento de 331 pb esperado para SaV foi encontrado em 30,1% (34/113) das amostras. Não houve correlação entre a infecção e o quadro clínico de diarreia ($p=0,59$), mas foi demonstrada uma proporção de infecção maior ($p=0,0001$) em animais de 22 a 28 dias de idade do que nos outros grupos etários ($p>0,05$). A análise filogenética revelou que as estirpes dos Estados do Mato Grosso do Sul e Paraná seqüenciadas são pertencentes ao GIII, tendo grande similaridade genética com a estirpe Cowden. As mesmas estirpes também revelaram alta identidade (72,2 a 90,2%) com isolados da Venezuela e Coreia. Já as estirpes dos outros Estados apresentaram pouca similaridade com o protótipo, mas alta identidade com estirpes detectadas no Japão e Holanda, demonstrando grande variabilidade genética das estirpes circulantes nos rebanhos suínos brasileiros.

Palavras-chave: Suínos. Leitões. Diarreia. Calicivirus. *Sapovirus*.

BARRY, A.F. **Diagnoses frequency and molecular characterization of porcine enteric calicivirus from Brazilian herds.** 2007. 74f. Dissertation (Master Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2007.

ABSTRACT

The strains of *Sapovirus* (SaV) genus were divided into five genogroups according to its genetic similarity of major capsid protein. Members from four genogroups may cause diarrhea in humans, and only strains from genogroup III (GIII) were related to enteric disease in pigs. Cowden is the GIII prototype strain and is the unique SaV adapted in tissue cultured. A few countries had described the presence of SaV from stool samples of piglets, however, it constitute an important etiological agent of diarrhea. The present study was developed to detect SaV from diarrheic and non-diarrheic piglet stool samples, correlate the infection with diarrheic disease and with the animals age; observe the frequency of infection and characterize one wild-type SaV strain from each State included in this study. Stool samples from 113 piglets up to 28 days of age were collected from pig farms located in the States of Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina, and Rio Grande do Sul during 2004 and 2005. The RT-PCR assay was performed with primers p289/290, designed to detect partial polymerase gene. The expected 331 bp amplicon of SaV was detected in 34 (30.1%) stool samples. There was no association between the infection and clinical signal of diarrhea ($p=0.59$), but the 22 to 28 days-old group of piglets ($p=0.0001$) was significantly more infected in comparison to others groups ($p>0.05$). Phylogenetic analysis demonstrated that sequenced strains from States of Mato Grosso do Sul and Paraná belong to GIII and had the highest identity with the Cowden strain. These strains also revealed elevate similarity (72.2 to 90.2%) with Venezuelan and Korean strains. However, the other strains had reduced similarity with the prototype, but were more related to the Japanese and Netherlanders SaV strains, demonstrating high genetic variability of the virus in Brazilian swine herds.

Keywords: Swine. Piglets. Diarrhea. Calicivirus. *Sapovirus*.

LISTA DE FIGURAS

Calicivírus animal

- Figura 1** – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) baseada no genoma parcial (2.626 nt) dos principais membros da família *Caliciviridae*, representando os quatro gêneros. Reconstrução em Kimura 2-parâmetro com valores de bootstrap em % (1000 replicações). Seqüências obtidas do GenBank com os seguintes códigos de acesso: VESV (AF181082); PAN (AF091736); SMSV (AF181081); FCV (M86379); Sapporo (U65427); Cowden (AF182760); EBHSV(Z69620); RHDV(M67473); Nebraska (AY082891); Norwalk (M87661); Jena vírus (AJ011099); Newbury Agent-2 (AF097917) e Norovirus suíno (AB074893). 17
- Figura 2** – Microscopia eletrônica de coloração negativa das duas estruturas morfológicas dos calicivírus. (A) Morfologia clássica com 32 depressões (cálices) ou em “Estrela-de-Davi”, presente nos vesivírus, lagovírus e sapovírus. (B) *Small round structured virus*. Estrutura dos norovírus e alguns calicivírus felinos. 18
- Figura 3** – Reconstrução, em *neighbor-joining*, da árvore filogenética baseada no gene (1658 nt) da proteína de capsídeo principal das estirpes protótipos do gênero SaV. Modelo Kimura 2-parâmetro com valores de bootstrap em % de 1000 replicações. As seqüências utilizadas foram adquiridas do GenBank com os seguintes códigos de acesso: Sapporo/82 (U65427); Parkville/94 (U73124); Mexico14917/00 (AF435813); Houston7-1181/90 (AF435814); Argentina39 (AY289803); London/92 (U95645); Cruise ship/00 (AY289804); Mexico340/90 (AF435812) e Cowden/80 (AF182760). A divisão dos genogrupos está indicada nas chaves. 21
- Figura 4** – Esquema representativo do genoma da estirpe padrão Cowden do genogrupo III do SaV. (A) Representação das duas regiões de leitura do RNA viral na orientação 5' → 3', em que os números representam a posição dos nucleotídeos e A_n a extremidade poliadenilada. (B) Proteínas codificadas pelo vírus, entre parênteses o número de aminoácidos. (C) Produtos da clivagem da poliproteína com seus respectivos sítios conservados entre os calicivírus. 24

Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Brazil, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III

- Fig.1** – Ethidium bromide stained agarose gel eletrophoresis of the eight stool samples from piglets positive to sapovirus amplified with primer pair p289/p290 by RT-PCR. Lane 1, 123 bp ladder; lane 2 human norovirus with 319 bp; lanes 3 to 10 porcine sapovirus with 331 bp; lane 11 negative control. 38
- Fig.2** – Phylogenetic tree reconstructed by neighbor-joining method (Kimura 2-parameter) and 1000 replicates among human, porcine and a Brazilian (BRA29-MS/04) isolate of SaV based on partial (285 nt) RdRp gene. Sequences used in the alignment were acquired from GenBank as follows accession numbers: Sapporo/82 (U65427), Lyon30388/98 (AJ251991), Manchester/93 (X86560), Houston/86 (U95643), Mexico14917 (AF435810), Parkville/94 (U73124), Houston/90 (U95644), Houston7-1181/90 (AF435811), Mexico340/90 (AF435809), London/92 (U95645), Lyon598/97 (AJ271056), Bristol/98 (AJ249939), Cruise ship/00 (AY157863), Argentina39 (AF405715), Cowden (AF182760), LL14 (AY425671) and BRA29-MS/04 (EF183480). Four genogroups of SaV genera are indicated. 39

Frequency and molecular characterization of porcine enteric calicivirus (PEC) in Brazilian swine herds

Fig.1 – Neighbor-joining phylogenetic tree (1000 replicates) based on the partial RdRp gene (288 nt) from published SaV strains and Brazilian isolates. Sequences used in the alignment were acquired from GenBank as follows accession numbers: Sapporo/82 (U65427), Mexico14917 (AF435810), Parkville/94 (U73124), London/92 (U95645), Cruise ship/00 (AY157863), Mexico340/90 (AF435809), Houston7-1181/90 (AF435811), Argentina39 (AF405715), Cowden (AF182760), Korean6802 (AY289186), (LL14 (AY425671), BRA52-PR/04 (EF183482), Aragua/1999 (AY633967), Miranda/2000 (AY633963), BRA29-MS/04 (EF183480), K7/JP (AB221130), K10/JP (AB221131), BRA04-SC/04 (EF183478), K11/JP (AB223000), SWECIII/112 (AY615814), BRA21-RS/04 (EF183479), K15/JP (AB223002), BRA37-MG/05 (EF183481), SWECIII/VA24a (AY615812), K8/JP (AB222999), K24/JP (AB223005), Norwalk (M87661) and SW918 (AB074893). 56

LISTA DE QUADROS

Calicivírus animal

- Quadro 1** – Classificação dos gêneros e espécies virais pertencentes à família
Caliciviridae 16
- Quadro 2** – Distribuição das principais estirpes de sapovírus em genogrupos e
genotipos, com base na seqüência do gene da proteína principal do capsídeo
viral..... 22
- Quadro 3** – Frequência de diagnóstico etiológico de sapovírus em fezes de suínos..... 26

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 CALICIVÍRUS ANIMAL.....	14
Histórico	14
Características Gerais	15
Vesivírus.....	16
Lagovírus.....	18
Norovírus.....	19
Sapovírus	20
Perspectivas	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 GERAL	28
2.2 ESPECÍFICOS	28
3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	29
3.1 DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORCINE ENTERIC CALICIVIRUS IN BRAZIL, GENETICALLY RELATED TO THE COWDEN STRAIN OF SAPOVIRUS GENOGROUP III.....	29
Abstract.....	30
Text.....	31
Acknowledgments	34
References	34
3.2 FREQUENCY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORCINE ENTERIC CALICIVIRUS (PEC) IN BRAZILIAN SWINE HERDS	40
Abstract.....	41
Introduction	42
Materials and Methods	43
Results	46
Discussion.....	47
Acknowledgments	50
References	50

4 CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	66
Apêndice A - Lista de Reagentes	67
Apêndice B – Soluções e Tampões	70
Apêndice C – Protocolo de Técnicas.....	72

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CALICIVÍRUS ANIMAL

Histórico

A primeira descrição da infecção pelo calicivírus em animais ocorreu em 1932 com o vírus do exantema vesicular dos suínos (VESV). O vírus foi considerado o agente etiológico de uma epidemia nos Estados Unidos que ocasionou a perda de 2,5 milhões de suínos pela morte, abortamento e abate para erradicar a doença. O último relato da enfermidade ocorreu em 1956 no Estado da Califórnia e em 1959 a doença foi considerada erradicada (CUBITT, 1994).

Os norovírus foram primeiramente descritos no ano de 1972 e estavam associados ao primeiro surto da doença, em 1968, em que alunos e professores de uma escola em Norwalk no Estado de Ohio, EUA, apresentaram vômito e diarreia. Porém, somente em 1981 foram classificados como calicivírus (ADLER; ZICKL, 1968; KAPIKIAN et al., 1972; GREENBERG et al., 1981; ATMAR; ESTES, 2001). Já os calicivírus com morfologia clássica (hoje classificados como sapovírus), foram detectados em seres humanos em 1976 em amostras de fezes de crianças com gastroenterite e assintomáticas (MADELEY; COSGROVE, 1976).

Os calicivírus foram inicialmente classificados como membros da família *Picornaviridae*. Em 1974, Burroughs e Brown propuseram a criação da família *Caliciviridae* devido aos calicivírus apresentarem características morfológicas distintas dos picornavírus, como tamanho e densidade das partículas virais, além da composição do capsídeo em somente uma proteína (BURROUGHS; BROWN, 1974). Outros estudos complementaram essa nova classificação com base na detecção de diferentes tamanhos de RNA viral a partir de células infectadas com calicivírus, demonstrando diferenças na replicação em relação aos picornavírus (EHRESMANN; SCHAFFER, 1977). Essa nova classificação foi descrita no Terceiro Relatório do Comitê Internacional de Taxonomia Viral em 1979 (CUBITT, 1994).

Os lagovírus foram detectados em 1984, na China, como um vírus de morfologia semelhante ao VESV ocasionando surtos de doença hemorrágica em criações de

coelhos (BASCUNANA; NOWOTNY; BELÁK, 1997) e mais tarde em lebres na Itália (WIRBLICH et al., 1994).

Características Gerais

A família *Caliciviridae* é constituída de quatro gêneros: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* (NoV) e *Sapovirus* (SaV) (Quadro 1 e Fig.1). Todos os membros não possuem envelope lipoprotéico, apresentam simetria icosaédrica e diâmetro variando de 27 a 39 nm. A densidade das partículas virais em CsCl é de 1.33-1.4 g cm⁻³, sendo sensíveis ao tratamento com tripsina, porém resistentes em faixas de pH de 4 a 5 (ICTVdB, 2007). Os calicivírus podem ser classificados em vírus com morfologia clássica, compostos por 32 depressões no capsídeo, e vírus com estrutura arredondada (*small round structured virus* – SRSV) (Fig.2). O genoma é constituído por RNA fita simples, linear, de polaridade positiva, poliadenilado na extremidade 3' e com tamanho variando de 7,4 a 8,3 kb. Na extremidade 5' de algumas estirpes virais há uma proteína (VPg), de aproximadamente 16 kDa, ligada covalentemente. A VPg está presente tanto no RNA genômico quanto no subgenômico, este último transcrito para codificar as proteínas estruturais do vírus (WIRBLICH; THIEL; MEYERS, 1996; SOSNOVTSEV; GARFIELD; GREEN, 2002; BELLLOT et al., 2003; OKA et al., 2005). A organização do genoma pode ser em duas ou três regiões abertas de leitura (*open reading frames* - ORFs), onde são codificadas as proteínas não-estruturais e estruturais do vírus (ICTVdB, 2007; GREEN et al., 2000).

Quadro 1 – Classificação dos gêneros e espécies virais pertencentes à família *Caliciviridae*

Família	Gênero	Espécie	Hospedeiro	Ano	País	Referência
<i>Caliciviridae</i>	<i>Lagovirus</i>	<i>European brown hare syndrome virus</i>	Lebre	1989	Itália	Lavazza; Vecchi, 1989
		<i>Rabbit hemorrhagic disease virus</i>	Coelho	1984	China	Liu et al., 1984
	<i>Norovirus</i>	<i>Norwalk virus</i>	Humano	1972	EUA	Kapikian et al., 1972
		Não-classificados	Bovino	1978	Reino Unido	Almeida; Craig; Hall, 1978
			Suíno	1998	Japão	Sugieda et al., 1998
			Rato	2003	EUA	Karst et al., 2003
	<i>Sapovirus</i>	<i>Sapporo virus</i>	Humano	1976	Reino Unido	Madeley; Cosgrove, 1976
		Não-classificados	Marta	2001	Canadá	Guo; Evermann; Saif, 2001
			Suíno	1980	EUA	Saif et al., 1980
	<i>Vesivirus</i>	Calicivírus felino	Felino	1957	EUA	Fastier, 1957
			Vírus do exantema vesicular suíno	Bovino	1983	EUA
			Cetáceo	1983	EUA	Smith; Skilling; Ridgway, 1983c
			Gambá	1995	EUA	Seal et al., 1995
			Leão Marinho	1972	EUA	Smith et al., 1973
			Primata	1983	EUA	Smith et al., 1983b
			Réptil	1986	EUA	Smith et al., 1986
			Suíno	1932	EUA	Mohler; Snyder, 1933
		Não-classificados	Marta	1980	EUA	Long; Evermann; Gorham, 1980
			Coelho	2005	Espanha	Martin-Alonso et al., 2005
Não-classificados	Calicivírus aviário	Frango	1981	Reino Unido	Gough; Spackman, 1981	
		Calicivírus canino	Cão	1985	Japão	Schaffer et al., 1985
		Nebraska	Bovino	1980	EUA	Chang; Saif, 1980*

*não-publicado

Vesivirus

O gênero *Vesivirus* compreende vírus causadores de doenças em animais, sendo todos cultiváveis em culturas celulares. Todos se apresentam, à microscopia eletrônica, como calicivírus clássicos, ou seja, a superfície do capsídeo é formada por depressões que se assemelham a cálices. O calicivírus felino (FCV), que é responsável por doenças do trato respiratório superior e ulcerações orais em gatos, é um dos vírus mais estudados, sendo suas características antigênicas bem conhecidas (THUMFART; MEYERS, 2002). Também faz parte desse gênero o vírus do exantema vesicular dos suínos (VESV), que nos animais infectados ocasiona sinais clínicos indistinguíveis aos da estomatite vesicular (*Vesiculovirus - Rhabdoviridae*), doença vesicular dos suínos (*Enterovirus - Picornaviridae*) e da febre aftosa (*Aphthovirus - Picornaviridae*). As lesões vesiculares podem estar presentes no focinho, lábios, língua, cavidade oral, patas, espaço interdigital e borda coronária do casco. Não raramente, podem ocorrer problemas reprodutivos como abortamento, havendo também relatos de diarreia grave (MADIN; TRAUM, 1955). Outro vesivírus de grande importância é

o *San Miguel sea lion virus* (SMSV), que ocasiona sinais clínicos em cetáceos e pinípedes (focas, leões marinhos) muito semelhantes aos presentes em suínos infectados com o VESV. Há também características antigênicas em comum entre ambos os vírus (NEILL; MEYER; SEAL, 1995). A transmissão inter-espécies já foi descrita entre focas, martas e suínos por meio da ingestão de alimentos e fezes contaminados com o SMSV (WILDER; DARDIRI, 1978). A organização genômica desses vírus se faz em três ORFs. Na ORF1 é codificada uma poliproteína que é clivada, simultaneamente à sua síntese, pela protease viral originando as proteínas não-estruturais do vírus. As ORF2 e ORF3 codificam as proteínas estruturais VP1 (principal) e VP2 (secundária), respectivamente (GREEN et al., 2000).

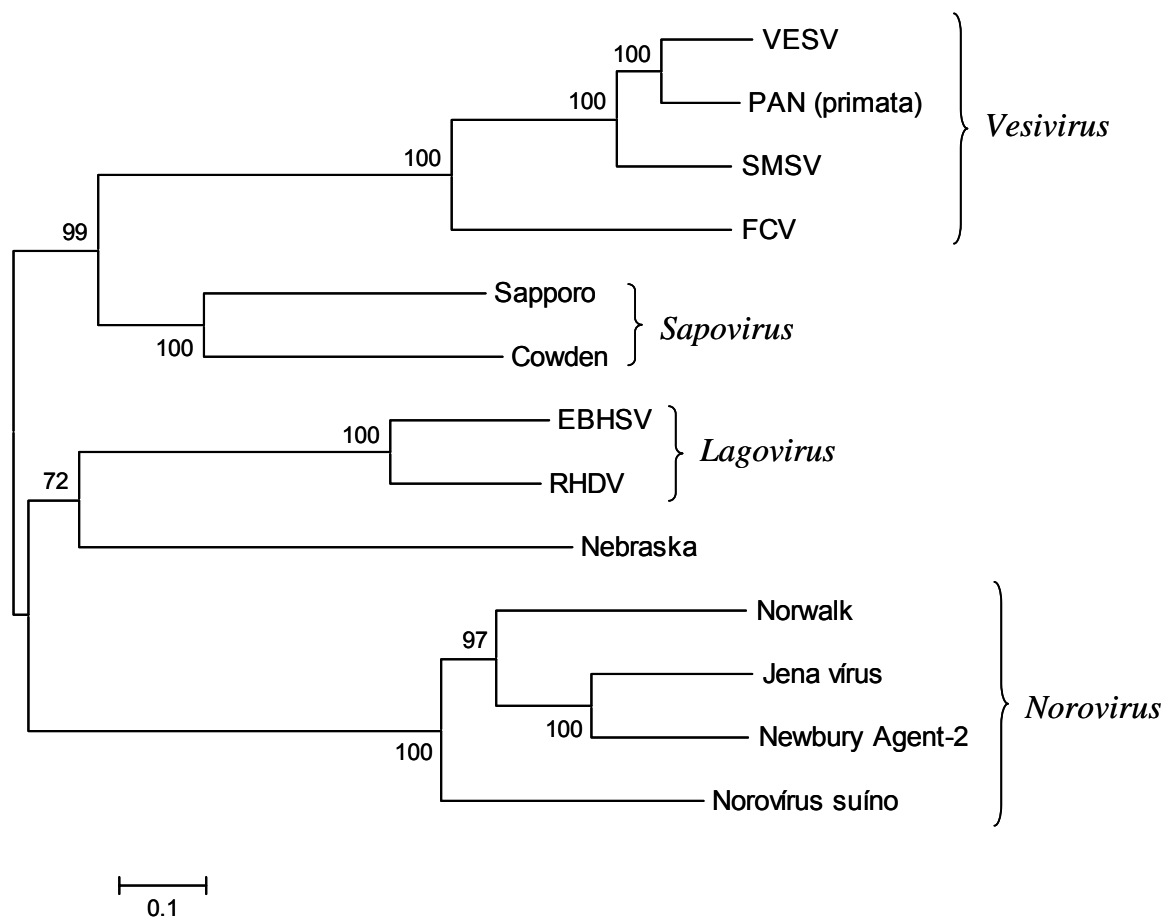
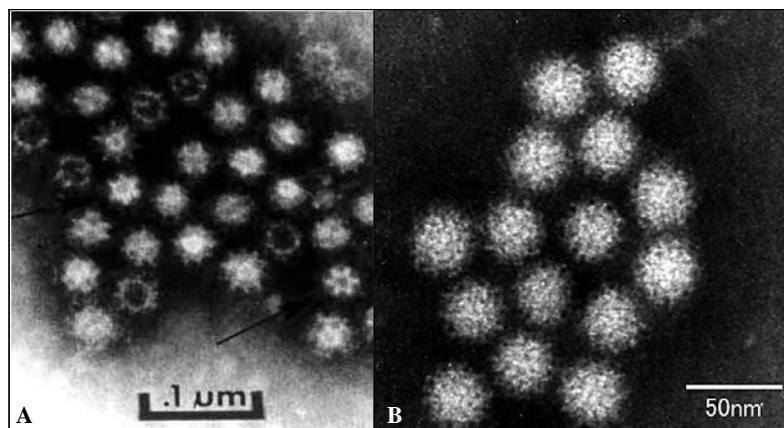


Figura 1 – Árvore filogenética (*neighbor-joining*) baseada no genoma parcial (2.626 nt) dos principais membros da família *Caliciviridae*, representando os quatro gêneros e a estirpe Nebraska (ainda não classificada). Reconstrução em Kimura 2-parâmetro com valores de bootstrap em % (1000 replicações). Sequências obtidas do GenBank com os seguintes códigos de acesso: VESV (AF181082); PAN (AF091736); SMSV (AF181081); FCV (M86379); Sapporo (U65427); Cowden (AF182760); EBHSV(Z69620); RHDV(M67473); Nebraska (AY082891); Norwalk (M87661); Jena vírus (AJ011099); Newbury Agent-2 (AF097917) e Norovírus suíno (AB074893).

Lagovírus

Os lagovírus incluem o *European brown hare syndrome virus* (EBHSV) e o *Rabbit hemorrhagic disease virus* (RHDV). Tanto lebres quanto coelhos infectados apresentam sinais clínicos bastante semelhantes decorrentes da degeneração dos hepatócitos, que resulta em necrose hepática. A taxa de mortalidade é bastante elevada podendo alcançar 100% em animais adultos. Morfologicamente o EBHSV e o RHDV são indistinguíveis e semelhanças antigênicas entre eles também já foram demonstradas utilizando-se soro hiperimune de coelhos infectados com o RHDV. Até o momento não foi possível adaptar em cultivo celular nenhuma estirpe identificada de lagovírus. O EBHSV e o RHDV podem se diferenciados por imunomicroscopia eletrônica, hemaglutinação e ELISA demonstrando que esses vírus, apesar de bastante relacionados, apresentam algumas diferenças antigênicas. A organização genômica ocorre em duas ORFs, sendo que na primeira são codificadas as proteínas não-estruturais e a proteína principal do capsídeo e na segunda uma proteína estrutural secundária. (OHLINGER et al., 1990; WIRBLICH et al., 1994).



Fonte: <http://researchnews.osu.edu/archive/calici.jpg> e www.pref.ehime.jp

Figura 2 – Microscopia eletrônica de contrastação negativa das duas estruturas morfológicas dos calicivírus. (A) Morfologia clássica com 32 depressões (cálices) ou em “Estrela-de-Davi”, presente nos vesivírus, lagovírus e sapovírus. (B) *Small round structured virus*. Estrutura dos norovírus e alguns calicivírus felinos.

Norovírus

Os NoV, anteriormente denominados “Norwalk-like virus”, são considerados os mais importantes causadores de gastroenterite não-bacteriana em adultos e crianças em países da Europa, nos Estados Unidos e Japão (INOUE et al., 2000; FRANKHAUSER et al., 2002; LOPMAN et al., 2003). A transmissão pode ocorrer pelo contato direto ou pela ingestão de água e alimentos contaminados (FRANKHAUSER et al., 1998). Em seres humanos a transmissão de NoV através da ingestão de moluscos e ostras contaminados também já foi relatada (COSTANTINI et al., 2006). Surto de infecção em cruzeiros marítimos e alojamentos improvisados devido a desastres ambientais também são descritos (CDC, 2005; ISAKBAEVA et al., 2006). Embora a presença de anticorpos e a detecção do vírus já tenham sido verificadas, a prevalência e a epidemiologia da doença ainda não estão completamente estabelecidas (FRANKHAUSER et al., 2002; GALLIMORE et al., 2004; FARKAS et al., 2005). Os hospedeiros naturais dos NoVs são os seres humanos, bovinos, suínos e ratos (*murine* norovírus - MNV). Ratos infectados com o MNV constituem um importante modelo experimental animal para o estudo da replicação e patogenicidade dos NoVs, uma vez que o MNV é o único NoV adaptado a cultivo celular e capaz de se replicar em um animal pequeno (WOBUS; THACKRAY; VIRGIN IV, 2006). Morfologicamente os NoV são classificados como *small round structured virus* e têm a característica de apenas se propagarem em cultivos celulares específicos como células dendríticas e macrófagos (DUIZER et al., 2004; WOBUS et al., 2004). O genoma viral é dividido em três ORFs, sendo que as proteínas não-estruturais são formadas a partir da clivagem de uma poliproteína codificada na primeira ORF e as duas proteínas estruturais codificadas na segunda e terceira ORFs. Com base nas características moleculares, as estirpes de NoV são divididas em cinco genogrupos (ANDO; NOEL; FRANKHAUSER, 2000; ZHENG et al., 2006). Os membros dos genogrupos I, II e IV são causadores de surtos de gastroenterite em seres humanos. Porém, estirpes isoladas de amostras de fezes de suínos demonstraram maior similaridade genética com as estirpes de NoV humanos do GII. (SUGIEDA; NAKAJIMA, 2002). As estirpes de NoV bovinos estão classificadas no GIII, separado em dois genótipos cujos protótipos são o Jena vírus e o Newbury Agent-2 (DASTJERDI et al., 1999; LIU et al., 1999). Os NoV de ratos são classificados no GV.

Sapovírus

Os SaVs, anteriormente denominados “Sapporo-like virus”, têm como protótipo a estirpe Sapporo/82, descrita em um surto de gastroenterite em um orfanato na cidade de Sapporo no Japão em outubro de 1977. Esses vírus apresentam-se com a configuração de Estrela-de-Davi, ou seja, à microscopia eletrônica têm morfologia clássica, sendo por isso, também chamados de calicivírus humanos clássicos. Em seres humanos a infecção ocorre principalmente em crianças e a doença normalmente se manifesta como uma diarreia moderada, embora infecções assintomáticas também possam ocorrer. A excreção viral é maior nos primeiros cinco dias pós-infecção, nos quais o vírus pode ser detectado diretamente nas fezes por microscopia eletrônica, imunomicroscopia eletrônica ou RT-PCR. O isolamento do SaV humano em cultivo celular, até o momento ainda não foi obtido. A imunidade humoral já foi detectada por até três meses pós-infecção. Porém, ainda não está estabelecido se os anticorpos realmente conferem proteção efetiva ou se esse aumento apenas reflete a infecção intestinal (CHIBA et al., 2000).

Infecções por SaV em seres humanos já foram detectadas em países da Europa (SCHUFFENECKER et al., 2001), Américas (FARKAS et al., 2004), Ásia (OKADA et al., 2002) e Oceania (HANSMAN et al., 2006) demonstrando a ampla circulação do vírus em todo o mundo. No Brasil, o vírus foi detectado em crianças com sinais clínicos de diarreia (NAKAMURA et al., 2006).

De acordo com o Grupo de Estudos de Calicivírus (CSG) do Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV) seqüências totais e parciais do genoma, associadas às características morfológicas, propriedades antigênicas, hospedeiros e sinais clínicos são aspectos suficientes para classificar uma estirpe viral de calicivírus, uma vez que a maioria dos calicivírus não são cultiváveis (GREEN et al., 2000). Também não há um modelo experimental animal descrito para SaV conhecendo-se, portanto, pouco sobre as estratégias de replicação, a patogenia e a resposta imunológica do hospedeiro.

O principal aspecto para o agrupamento dos calicivírus em um determinado gênero é a análise filogenética. Com base nas características moleculares da proteína principal do capsídeo, os sapovírus são classificados, filogeneticamente, em cinco genogrupos (Fig.3 e Quadro 2) (FARKAS et al., 2004). Embora não seja utilizado como padrão, essa mesma classificação se manteve nas análises moleculares realizadas em regiões dos genes da RNA polimerase RNA dependente (RpRd), ORF2, proteína principal de capsídeo e da região 3’

não-traduzida (UTR) (SCHUFFENECKER et al., 2001). Os representantes de cada genogrupo compartilham aspectos comuns da organização do genoma e o número de regiões abertas de leitura (GREEN et al., 2000).

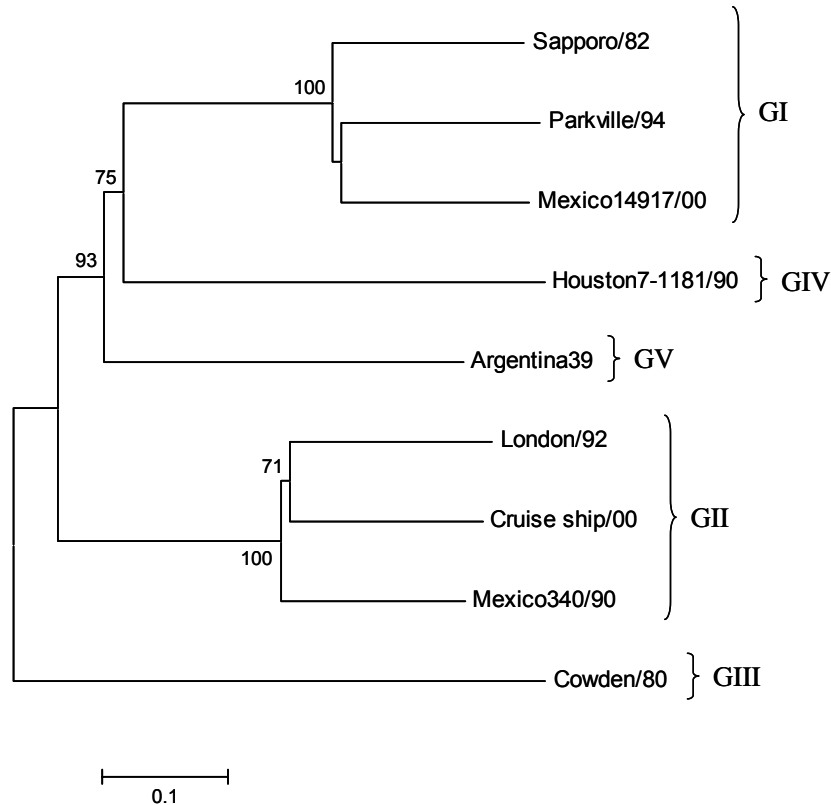


Figura 3 – Reconstrução, em *neighbor-joining*, da árvore filogenética baseada no gene (1658 nt) da proteína de capsídeo principal das estirpes protótipos do gênero SaV. Modelo Kimura 2-parâmetro com valores de bootstrap em % de 1000 replicações. As seqüências utilizadas foram adquiridas do GenBank com os seguintes códigos de acesso: Sapporo/82 (U65427); Parkville/94 (U73124); Mexico14917/00 (AF435813); Houston7-1181/90 (AF435814); Argentina39 (AY289803); London/92 (U95645); Cruise ship/00 (AY289804); Mexico340/90 (AF435812) e Cowden/80 (AF182760). A divisão dos genogrupos está indicada nas chaves.

No genogrupo I (GI) o protótipo é a estirpe Sapporo/92. Esse genogrupo é dividido em três genótipos ou *clusters*, e as estirpes, embora com características filogenéticas bastante semelhantes, induzem respostas imunológicas distintas. A organização do genoma ocorre em duas ORFs, sendo que na primeira são codificadas as proteínas não-estruturais e a VP1 e na segunda a proteína estrutural VP2. Assim como nos genogrupos IV e V, no GI há uma terceira ORF sobreposta à região 5' do gene da proteína principal do capsídeo que codifica uma proteína de massa molecular semelhante à VP2. O genogrupo II (GII) é constituído de três genótipos, sendo este o único genogrupo humano em que não há a terceira ORF sobreposta (CLARKE; LAMBDEN, 2000).

As estirpes de SaV de origem suína são classificadas no genogrupo III (GIII) que tem como protótipo a estirpe Cowden, descrita pela primeira vez em 1980, nos Estados Unidos, por meio de microscopia eletrônica do conteúdo intestinal de um leitão de 27 dias de idade com sintomatologia de diarreia (SAIF et al., 1980). Neste mesmo estudo também foi verificado que soros hiperimunes de coelhos e gatos infectados com calicivírus não reagiram, à IEM, com o vírus identificado no conteúdo intestinal do leitão.

Assim como ocorre no SaV humano, a existência de mais de um genogrupo com estirpes suínas já foi proposta. Esses genogrupos são denominados GVI e GVII e tem como protótipos as estirpes JJ681 e K7/JP, respectivamente (WANG et al., 2005; YIN et al., 2006; WANG; COSTANTINI; SAIF, 2007).

Quadro 2 – Distribuição das principais estirpes de sapovírus em genogrupos e genotipos, com base na sequência do gene da proteína principal do capsídeo viral

<i>Sapovirus</i>	Genotipo 1	Genotipo 2	Genotipo 3
Genogrupo I	Sapporo/82	Houston/90	Stockholm/97
	Houston/86	Parkville/94	Mexico14917/00
	Manchester/93		
	Plymouth/92		
	Lyon30388/98		
Genogrupo II	London/92	Mexico340/90	Cruise ship/00
	Lyon598/97		
	Bristol/98		
Genogrupo III*	Cowden/80		
Genogrupo IV*	Houston7-1181/90		
Genogrupo V*	Argentina39		

* Genogrupos não subdivididos em genotipos

Fonte: Farkas et al., 2004

Em leitões experimentalmente infectados a estirpe selvagem Cowden, ou seja, não adaptada em cultivo celular, ocasionou quadro clínico de diarreia profusa e anorexia. A histopatologia revelou atrofia das vilosidades do epitélio do intestino delgado proximal e o vírus foi detectado por imunofluorescência direta (FLYNN; SAIF; MOORHEAD, 1988). A

estirpe Cowden do SaV já foi adaptada a cultivo celular tanto em células primárias quanto linhagens celulares contínuas originadas de rim de suínos (LLC-PK) cultivadas em meio suplementado com conteúdos intestinais, provenientes de leitões gnobióticos não infectados (FLYNN; SAIF, 1988; PARWANI et al., 1991). Mais recentemente, constatou-se que ácidos biliares atuam como fator ativador da replicação viral em células LLC-PK (CHANG et al., 2004).

O genoma da estirpe Cowden já foi totalmente seqüenciado, e embora existam algumas mutações entre a estirpe selvagem e a estirpe adaptada em cultivo celular, a caracterização do vírus permitiu classificar algumas estirpes isoladas em outros surtos, como pertencentes ao mesmo genogrupo. A fita simples do RNA, excluindo a cauda de poli A da posição 3', é constituída de 7.320 nucleotídeos. O genoma é organizado em duas ORFs sendo que na primeira é codificada uma poliproteína cujos produtos da clivagem geram proteínas não-estruturais e a proteína principal do capsídeo (VP1). Essa poliproteína é formada por 2.254 aminoácidos que darão origem a 2C helicase, 3C-like protease, 3D RNA polimerase RNA dependente e a proteína estrutural de 544 aminoácidos, podendo a clivagem acontecer durante ou após a tradução. Sítios altamente conservados, característicos de proteínas não-estruturais dos calicivírus estão presentes na poliproteína: GPPGIGKT para 2C helicase, GDCCG para 3C-like protease, GLPSG e YGDD para 3D RNA polimerase RNA dependente (Fig.4). A VPg ligada à extremidade 5' do genoma ainda não foi observada na estirpe Cowden. A VP1 pode ser dividida em três regiões sendo a primeira e a terceira as mais conservadas e a segunda chamada de região hipervariável, em que se determina a similaridade com outras estirpes para a caracterização de um novo isolado. Esta região contém múltiplos determinantes antigênicos que são reconhecidos por anticorpos monoclonais. A segunda ORF é formada por 495 nucleotídeos que codificam uma pequena proteína básica hidrofílica de 164 aminoácidos, provavelmente com função estrutural, e que por sua polaridade positiva interage com outras proteínas ou com o ácido nucléico viral (GUO et al., 1999).

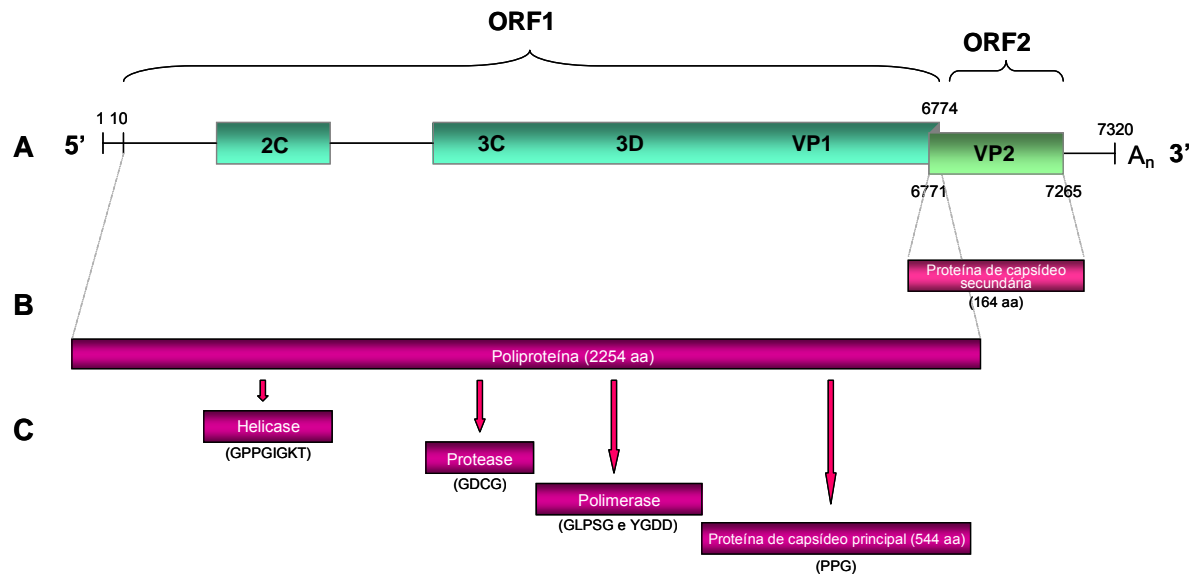


Figura 4 – Esquema representativo do genoma da estirpe padrão Cowden do genogrupo III do SaV. (A) Representação das duas regiões de leitura do RNA viral na orientação 5' → 3', em que os números representam a posição dos nucleotídeos e A_n a extremidade poliadenilada. (B) Proteínas codificadas pelo vírus, entre parênteses o número de aminoácidos. (C) Produtos da clivagem da poliproteína com seus respectivos sítios conservados entre os calicivírus.

Devido a grande variabilidade dos calicivírus, diversos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram desenhados para amplificar diferentes regiões do genoma viral na tentativa de caracterizar as estirpes circulantes de SaV (JIANG et al., 1999; OKADA et al., 2006; WANG et al., 2006a).

Em suínos, utilizando-se a técnica da RT-PCR, o SaV já foi detectado na Coreia (KIM et al., 2006), Estados Unidos (WANG et al., 2006b), Hungria (REUTER; BÍRÓ; SZÜCS, 2006), Japão (YIN et al., 2006), Venezuela (MARTÍNEZ et al., 2006) e Holanda (van der HEIDE et al., 2004 não publicado) (Quadro 3). A frequência da infecção pelo SaV é bastante variável (8,8 a 62%), e embora existam poucos estudos epidemiológicos é possível que haja correlação entre a infecção e a idade dos animais. A idade provavelmente está mais relacionada a fatores extrínsecos, como estresse pós-desmame e queda na imunidade passiva, do que a fatores intrínsecos do animal (MARTÍNEZ et al., 2006; WANG et al., 2006b). Kim et al. (2006) correlacionaram a infecção pelo SaV com a presença de sinais clínicos de diarreia, assim como ocorreu em leitões experimentalmente infectados com a estirpe padrão Cowden (GUO et al., 1999). Porém, nos trabalhos conduzidos em outros países essa associação não foi observada (MARTÍNEZ et al., 2006; REUTER; BÍRÓ; SZÜCS, 2006; WANG et al., 2006b; YIN et al., 2006).

A alta similaridade genética com a estirpe padrão Cowden foi observada em pelo menos uma estirpe viral de cada país em que o SaV foi detectado nas fezes de suínos.

Contudo, nem todos os isolados apresentaram identidade suficiente para serem classificados no mesmo genotipo do protótipo Cowden, sugerindo que, assim como nos SaV originados de seres humanos, existam mais de um genotipo do vírus suíno no GIII, ou até mais de um genogrupo de SaV suíno (MARTÍNEZ et al., 2006; KIM et al., 2006; REUTER; BÍRÓ; SZÜCS, 2006; WANG et al., 2005, 2006; YIN et al., 2006). Além da alta taxa de mutação identificada nos SaV, há ainda a descrição de recombinações virais entre estirpes suínas, aumentando a variabilidade genética, e entre estirpes humanas e suínas, sugerindo a probabilidade do potencial zoonótico do vírus (WANG et al., 2005).

Quadro 3 – Frequência de diagnóstico etiológico de sapovírus em fezes de suínos

País	Método diagnóstico	Origem	Idade	Características das fezes	Amostras		Referência
					analisadas	positivas (%)	
Coréia	nested-PCR	31 rebanhos	lactente (<i>n</i> =50) desmamado (<i>n</i> =52)	diarréicas	102	9 (8,8)	Kim et al., 2006
EUA	RT-PCR hibridização em placa	7 rebanhos 1 abatedouro	1 mês a >1 ano	diarréicas (<i>n</i> =11) normais (<i>n</i> =610)	621	389 (62,0)	Wang et al., 2006
Hungria	RT-PCR	2 rebanhos	até 12 dias (<i>n</i> =8) 2 a 6 meses (<i>n</i> =5) 2 anos (<i>n</i> =4)	diarréicas (<i>n</i> =6) normais (<i>n</i> =11)	17	2 (11,8)	Reuter et al., 2006
Japão	RT-PCR	Coleção de lab. diagnóstico veterinário	até 5 meses	diarréicas	24	10 (41,7)	Yin et al., 2006
Venezuela	RT-PCR	7 rebanhos	1 a 9 semanas	diarréicas (<i>n</i> =63) normais (<i>n</i> =141)	204	36 (17,6)	Martínez et al., 2006

Perspectivas

Em animais de produção a identificação do agente causador de uma enfermidade é de grande importância para a implementação de medidas profiláticas e de controle da doença, como manejo sanitário adequado e programas vacinais, com o objetivo de reduzir os custos e melhorar a produtividade do rebanho.

As diarreias representam a principal causa de morbidade e mortalidade no período neonatal para várias espécies de animais. Mesmo já sendo descritos diversos patógenos causadores de diarreia, incluindo protozoários, bactérias e vírus, em muitas situações não é possível determinar o agente etiológico da doença. A técnica de diagnóstico utilizada pode não ser eficiente, mas também pode ocorrer a existência de patógenos ainda não descritos e, portanto, não avaliados rotineiramente.

Apesar de ser descrito há poucos anos e apenas em alguns países, já é possível concluir que os SaVs constituem um importante patógeno para os suínos, e, embora nem sempre haja sinais clínicos de diarreia, podem ocasionar lesões intestinais potencializando a ação de outros microrganismos.

Os resultados do presente estudo, que identificaram a presença do Sav em rebanhos suínos brasileiros, abrem a perspectiva da elaboração de estudos de caráter epidemiológico mais abrangentes, tanto para determinação da prevalência da infecção quanto para a definição de alguns dados epidemiológicos. Destacam-se entre esses a correlação ou não com quadros clínicos diarreicos em infecções singulares e mistas com outros enteropatógenos e faixa etária de maior susceptibilidade.

Além da importância dos SaV em sanidade animal, existe ainda a possibilidade de estirpes virais de origem suína serem transmitidas a seres humanos, caracterizando o potencial zoonótico da infecção. O suíno pode ser um reservatório da doença, pois estirpes de origem suína apresentaram alta similaridade com estirpes humanas. Devido à alta taxa de mutação do vírus e a pequena extensão do RNA viral, além da formação de quasiespécies virais podem surgir novas espécies de vírus capazes de reconhecer tanto receptores em células humanas quanto em suínas. Essas evidências possibilitam ainda a elaboração de estudos de caráter molecular que envolvam regiões genômicas mais abrangentes em estirpes virais identificadas no Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Avaliar a presença do calicivírus entérico suíno em amostras de fezes de leitões provenientes dos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

2.2 ESPECÍFICOS

- Implementar a técnica da RT-PCR, para a detecção do gene da RNA polimerase, para o diagnóstico do calicivírus entérico suíno em amostras de fezes de leitões;
- Determinar a frequência de diagnóstico do calicivírus entérico suíno;
- Correlacionar a presença do calicivírus entérico suíno com o sinal clínico de diarreia e com a faixa etária dos animais infectados;
- Realizar análises filogenéticas a partir do seqüenciamento de amplicons obtidos na RT-PCR.

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

3.1 DETECTION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORCINE ENTERIC CALICIVIRUS IN BRAZIL, GENETICALLY RELATED TO THE COWDEN STRAIN OF SAPOVIRUS GENOGROUP III*

* Artigo redigido sob as normas de publicação do periódico *Research in Veterinary Science*, disponível em: www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/623070/authorinstructions

SHORT COMMUNICATION

Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Brazil, genetically related to the Cowden strain of sapovirus genogroup III

A. F. Barry*, A. F. Alfieri, A. A. Alfieri

Laboratory of Animal Virology, Department of Preventive Veterinary Medicine,
Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário, PO Box 6001, 86051-990,
Londrina, Paraná, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: 55 43 3348 5997; fax: 55 43 3348 5997.

E-mail address: alinebarry@uol.com.br

Abstract. *Sapovirus* of the *Caliciviridae* family is an important cause of acute gastroenteritis in children and piglets. This genus is divided into five genogroups, but only strains from the third genogroup (GIII) were associated with infections in swine. Despite the high prevalence in some countries, there are no studies relative to the presence of porcine enteric sapovirus infections in piglets in Brazil. In the present study, 18 fecal specimens (13 diarrheic) from piglets up to 28 days were evaluated to determine the presence of sapovirus by RT-PCR assay, with primers p289/290 for RNA polymerase gene detection. In 44.4% (8/18) fecal samples a 331bp fragment was amplified. One of these isolates was sequenced; phylogenetic analysis revealed high similarity, with nucleotides (87.3%) and amino acids (97.8%) to the Cowden strain, the GIII prototype of porcine enteric calicivirus. This is the first description of sapovirus in Brazilian swine herds.

Keywords: Swine, Piglets, Diarrhea, Calicivirus, *Sapovirus*

Caliciviruses are small, non-enveloped viruses with 27 to 35 nm in diameter. Their genome has 7.4 to 8.3 kb and is composed of single-stranded poly-adenylated RNA with positive polarity that encodes major (VP1) and minor (VP2) structural proteins, and nonstructural proteins including RNA dependent RNA polymerase (RdRp) (ICTVdB). Four genera have been established in the *Caliciviridae* family: *Vesivirus*, *Lagovirus*, *Norovirus* (NoV), and *Sapovirus* (SaV) (Green et al., 2000). In animals, lagovirus and vesivirus are associated with a number of important hemorrhagic, respiratory, and vesicular diseases. In humans and animals, norovirus and sapovirus are associated with gastroenteritis (Gallimore et al., 2004; Kim et al., 2006; Martínez et al., 2006; Yin et al., 2006).

Based on the capsid gene, the *Sapovirus* genus can be classified into five genogroups: GI, GII, GIV, and GV that infect humans, and GIII infect pigs (Farkas et al., 2004). The Cowden strain causes diarrhea and intestinal lesions in gnotobiotic pigs, and is considered the prototype of the GIII (Guo et al., 1999; Wang et al., 2005, 2006).

In this study, we describe the detection of SaV in stool samples from piglets in Brazilian swine farms by RT-PCR assay. Additionally, we classify the isolate based on partial sequence of the RdRp gene identity and phylogenetic analysis with other published SaVs strains.

Eighteen stool samples were collected from piglets up to 28 days of age with clinical signs of diarrhea (n=13) and asymptomatic (n=5) from three Brazilian swine farms located in Mato Grosso do Sul (MS) State (S 19° 23' 43" W 54° 33' 59"), during 2004. Viral RNA was extracted from 10% (w/v) of fecal suspensions in PBS using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidinium isothiocyanate method according to Barreiros et al. (2004). A stool sample from a child with norovirus infection detected by RT-PCR assay and electron microscopy was used as positive control. Reverse transcription and PCR was performed using the primers p289 (5'-TGACAATGTAATCATCACCATA-3') and p290 (5'-GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3') designed by Jiang et al. (1999) to

amplify a 319 or 331 bp fragment from RdRp gene of norovirus or sapovirus, respectively. The RT-PCR products were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel ethidium bromide stained and visualized under UV light. The PCR amplicon was purified using GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), quantified with 2% agarose gel using Low DNA Mass Ladder (Invitrogen™, USA) and sequenced in MegaBACE™ 1000 and Thermo Sequenase™ II DNA Polymerase, DYEnamic™ ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, USA) according to the manufactures instructions using the forward and reverse primers. Sequence editing was performed with Phred and CAP3 softwares (<http://adenina.biomol.unb.br/phph/>). Translation and verification of conserved motifs was done by using Gene Runner version 3.05. Homology searches were carried out by using the NCBI databases and the basic analysis was done by BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) followed by multiple alignments by CLUSTAL W (version1.4) and sequence identity matrix using BioEdit v7.0.5.3. Phylogenetic distances and tree was generated by using Mega v3.1 software.

Sapoviruses were detected by RT-PCR assay in 44.4% (8/18) of analyzed stool samples, five of them from diarrheic piglets (Fig.1). One sample (BRA29-MS/04), from a 22-28 days-old piglet with diarrhea, was sequenced, and when compared to other sequences by BLAST, a high similarity with porcine sapoviruses was revealed. Before proceed with the analysis, the sequence was translated and the presence of GLPSG and YGDD RdRp conserved motifs was verified.

To classify the Brazilian isolate, BRA29-MS/04 was aligned with 16 published SaV sequences enclosing members of all clusters from five genogroups, resulting in a 285 nucleotides fragment. The intra-genogroup distance (overall average of 0.34) was compared to investigate whether BRA29-MS/04 was a GIII strain. Phylogenetic distances based on nucleotides alignments in that partial RdRp gene ranged from 0.03 to 0.34 between members

of the same genogroup. Houston7-1181/90 strain, the GIV prototype, had lower distance with GII members and was not included in this analysis. BRA29-MS/04 had 0.13 and 0.11 of nucleotide distance with Cowden and LL14 strains, respectively. The distance between BRA29-MS/04 and human SaVs genogroups, GI, GII and GV, range from 0.40 to 0.48 (data not shown).

Schuffenecker et al. (2001) comparing distances between 11 SaVs strains in five different regions of the genome (RdRp, 3'ORF, capsid overlap, 3'UTR, and capsid) verified that the same genogroups and genetic clusters organization was maintained throughout all the genome regions examined. A similar study was performed during which 17 sequences were classified according to the capsid gene, in nine genetic clusters within five genogroups. However, the same organization was not observed in the RdRp gene (Farkas et al., 2004). Despite these different conclusions, the classification of GIII Cowden strain was identified in these two studies as one distinct genogroup either in RdRp partial gene or in capsid gene; higher variation occurs in humans SaVs organization.

When compared with the 16 SaV strains used in this study, BRA29-MS/04 showed the highest sequence identities with Cowden strain (87.3%) and LL14 (89.4%) (Table1). The amino acid analysis (95 aa) revealed 97.8% and 98.9% identity with Cowden and LL14, respectively, whereas the highest similarity with another strain was 64.2% with Parkville/94 (data not shown). Based on identity and phylogenetic analysis the BRA29-MS/04 was classified as a strain from GIII (Fig.2).

These results have increased the scope of virus that may be present in feces of piglets in Brazilian swine farms. The strain identified in the State of Mato Grosso do Sul was closely related with Cowden strain that was already associated with intestinal lesions and diarrhea. Further studies are needed to understand the epidemiology and biology of the strains circulating in our country and the role that these infections may have on piglets with diarrhea.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. J.P. Gagliardi Leite (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil) for providing norovirus positive fecal sample and the Brazilian Institutes CNPq, CAPES, FINEP and Fundação Araucária for financial support. Alfieri, A.A. and Alfieri, A.F. are recipient of CNPq fellowships.

REFERENCES

- Barreiros, M.A.B., Alfieri, A.F., Médici, K.C., Leite, J.P.G., Alfieri, A.A., 2004. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 51, 104–109.
- Chang, K.O., Sosnovtsev, S.V., Belliot, G., Kim, Y., Saif, L.J., Green, K.Y., 2004. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* 101, 8733-8738.
- Farkas, T., Zhong, W.M., Jing, Y., Huang, P.W., Espinosa, S.M., Martinez, N., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Pickering, L.K., Jiang, X., 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology* 149, 1309-1323.
- Gallimore, C.I., Barreiros, M.A.B., Brown, D.W.G., Nascimento, J.P., Leite, J.P.G., 2004. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children's day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 321-326.

Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., Thiel, H.J., 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *The Journal of Infectious Diseases* 181, 322-330.

Guo, M., Chang, K.O., Hardy, M.E., Zhang, Q., Parwani, A.V., Saif, L.J., 1999. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *Journal of Virology* 73, 9625-9631.

ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4.

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>>. Access in: 15 jan. 2007.

Jiang, X., Huang, P.W., Zhong, W.M., Farkas, T., Cubitt, D.W., Matson, D.O., 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 83, 145-154.

Kim, H.J., Cho, H.S., Cho, K.O., Park, N.Y., 2006. Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. *Journal of Veterinary Medicine Series B Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 53, 155-159.

Martínez, M.A., Alcalá, A.C., Carruyo, G., Botero, L., Liprandi, F., Ludert, J.E., 2006. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Veterinary Microbiology* 116, 77-84.

Schuffenecker, I., Ando, T., Thouvenot, D., Lina, B., Aymard, M., 2001. Genetic classification of “Sapporo-like viruses”. *Archives of Virology* 146, 2115-2132.

Wang, Q.W., Han, M.G., Funk, J.A., Bowman, G., Janies, D.A., Saif, L.J., 2005. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5963-5972.

Wang, Q.W., Souza, M., Funk, J.A., Zhang, W., Saif, L.J., 2006. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2057-2062.

Yin, Y., Tohya, Y., Ogawa, Y., Numazawa, D., Kato, K., Akashi, H., 2006. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. *Archives of Virology* 151, 1749-1759.

Table 1 – Nucleotide sequence identity matrix of partial RdRp gene (285 nt) among BRA29-MS/04 wild-type SaV strain, isolated from a piglet stool sample, and 16 published SaVs strains, representing all clusters into five genogroups.

Genogroup/cluster	Strain	Sapp	Hous86	Manch	Lyon	Park	Hous90	Mex14	Lond	Ly598	Bristol	Mex	Cruise	Cowden	LL14	BRA29	Hous	Arg
GI/1	Sapporo/82	ID	0,922	0,905	0,905	0,673	0,677	0,726	0,649	0,614	0,649	0,645	0,645	0,561	0,561	0,554	0,638	0,607
	Houston/86	0,922	ID	0,912	0,894	0,687	0,698	0,719	0,666	0,631	0,659	0,652	0,652	0,564	0,564	0,561	0,642	0,614
	Manchester/93	0,905	0,912	ID	0,877	0,673	0,684	0,733	0,656	0,628	0,656	0,649	0,652	0,55	0,543	0,533	0,628	0,6
	Lyon30388/98	0,905	0,894	0,877	ID	0,68	0,684	0,715	0,642	0,617	0,656	0,635	0,638	0,54	0,554	0,557	0,638	0,582
GI/2	Parkville/94	0,673	0,687	0,673	0,68	ID	0,971	0,733	0,659	0,645	0,677	0,68	0,68	0,607	0,614	0,603	0,652	0,585
	Houston/90	0,677	0,698	0,684	0,684	0,971	ID	0,719	0,663	0,645	0,684	0,691	0,666	0,603	0,61	0,596	0,635	0,582
GI/3	Mexico14917	0,726	0,719	0,733	0,715	0,733	0,719	ID	0,691	0,635	0,68	0,649	0,67	0,575	0,571	0,582	0,67	0,592
GII/1	London/92	0,649	0,666	0,656	0,642	0,659	0,663	0,691	ID	0,894	0,926	0,796	0,785	0,596	0,6	0,596	0,768	0,575
	Lyon598/97	0,614	0,631	0,628	0,617	0,645	0,645	0,635	0,894	ID	0,912	0,782	0,747	0,561	0,564	0,557	0,74	0,564
	Bristol/98	0,649	0,659	0,656	0,656	0,677	0,684	0,68	0,926	0,912	ID	0,814	0,775	0,61	0,614	0,607	0,768	0,592
GII/2	Mexico340/90	0,645	0,652	0,649	0,635	0,68	0,691	0,649	0,796	0,782	0,814	ID	0,789	0,596	0,589	0,592	0,792	0,578
GII/3	Cruise ship/00	0,645	0,652	0,652	0,638	0,68	0,666	0,67	0,785	0,747	0,775	0,789	ID	0,592	0,607	0,61	0,771	0,578
GIII	Cowden	0,561	0,564	0,55	0,54	0,607	0,603	0,575	0,596	0,561	0,61	0,596	0,592	ID	0,971	0,873	0,589	0,564
	LL14	0,561	0,564	0,543	0,554	0,614	0,61	0,571	0,6	0,564	0,614	0,589	0,607	0,971	ID	0,894	0,596	0,571
	BRA29-MS/05	0,554	0,561	0,533	0,557	0,603	0,596	0,582	0,596	0,557	0,607	0,592	0,61	0,873	0,894	ID	0,596	0,55
GIV	Houston7-1181/90	0,638	0,642	0,628	0,638	0,652	0,635	0,67	0,768	0,74	0,768	0,792	0,771	0,589	0,596	0,596	ID	0,543
GV	Argentina39	0,607	0,614	0,6	0,582	0,585	0,582	0,592	0,575	0,564	0,592	0,578	0,578	0,564	0,571	0,55	0,543	ID

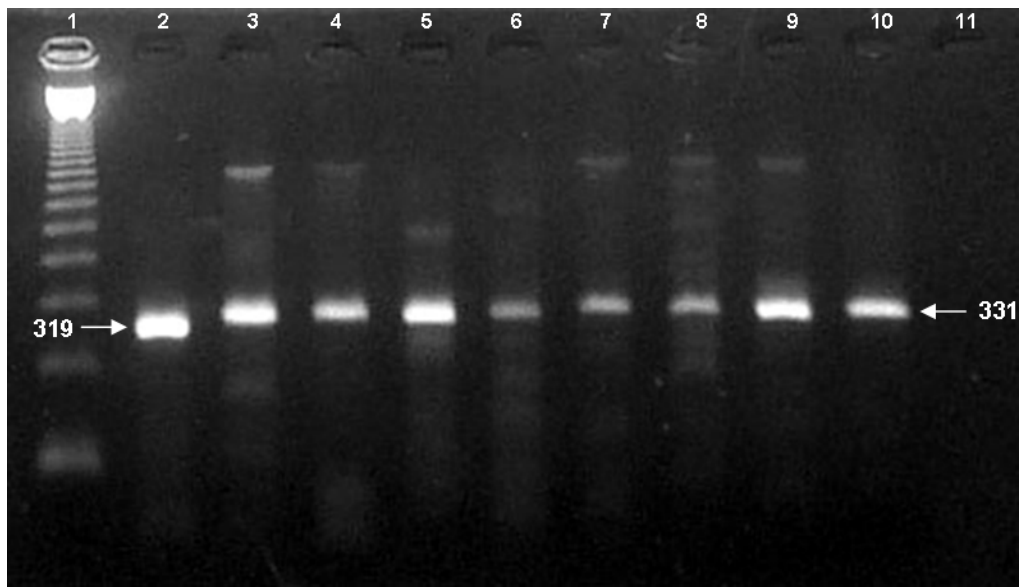


Fig.1. Ethidium bromide stained agarose gel electrophoresis of the eight stool samples from piglets positive to sapovirus amplified with primer pair p289/p290 by RT-PCR. Lane 1, 123 bp ladder; lane 2 human norovirus with 319 bp; lanes 3 to 10 porcine sapovirus with 331 bp; lane 11 negative control (ultrapure water).

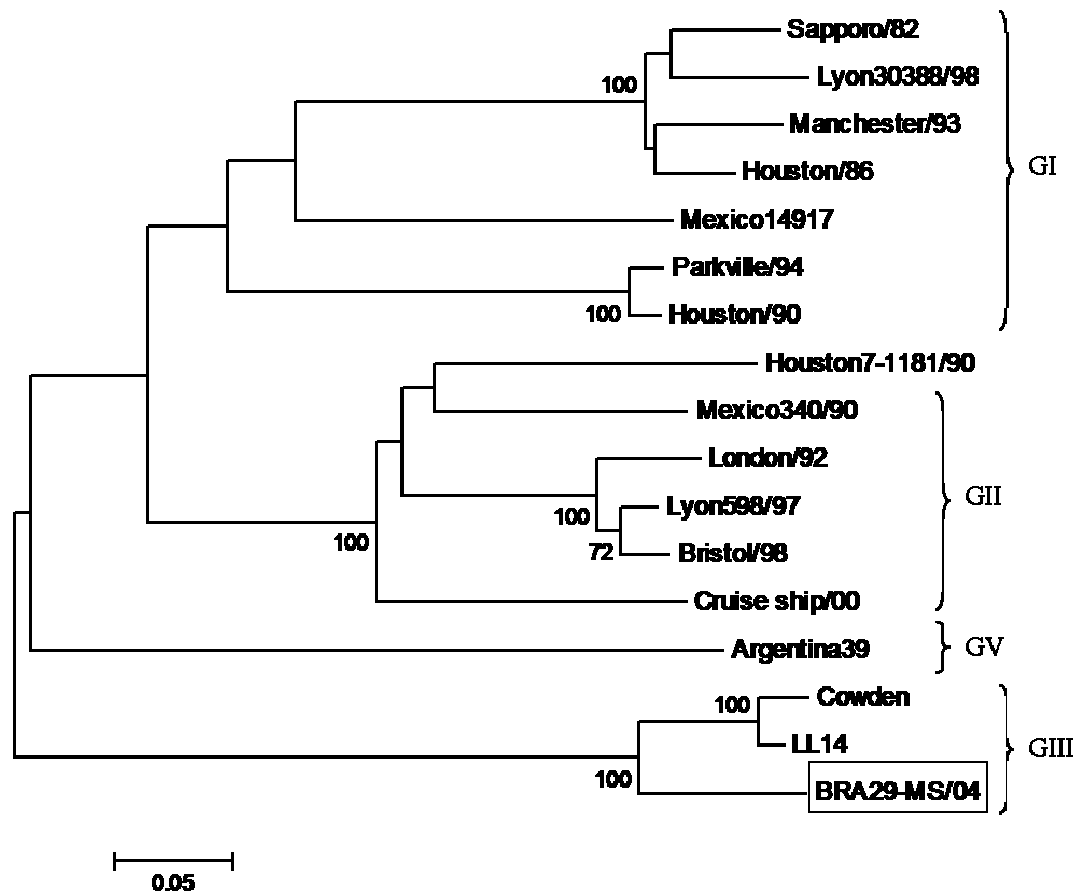


Fig.2. Phylogenetic tree reconstructed by neighbor-joining method (Kimura 2-parameter) and 1000 replicates among human, porcine and a Brazilian (BRA29-MS/04) isolate of SaV based on partial (285 nt) RdRp gene. Sequences used in the alignment were acquired from GenBank as follows accession numbers: Sapporo/82 (U65427), Lyon30388/98 (AJ251991), Manchester/93 (X86560), Houston/86 (U95643), Mexico14917 (AF435810), Parkville/94 (U73124), Houston/90 (U95644), Houston7-1181/90 (AF435811), Mexico340/90 (AF435809), London/92 (U95645), Lyon598/97 (AJ271056), Bristol/98 (AJ249939), Cruise ship/00 (AY157863), Argentina39 (AF405715), Cowden (AF182760), LL14 (AY425671) and BRA29-MS/04 (EF183480). Four genogroups of SaV genera are indicated.

3.2 FREQUENCY AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PORCINE ENTERIC CALICIVIRUS (PEC) IN BRAZILIAN SWINE HERDS*

* Artigo redigido sob as normas de publicação do periódico *Veterinary Microbiology*, disponível em: www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/503320/authorinstructions

ORIGINAL RESEARCH PAPER**Frequency and molecular characterization of porcine enteric calicivirus (PEC)
in Brazilian swine herds**

Aline F. Barry, Alice F. Alfieri, and Amauri A. Alfieri*

Laboratory of Animal Virology, Department of Preventive Veterinary Medicine,
Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário, Londrina, Paraná, Brazil.

*Corresponding author at: Laboratory of Animal Virology, Department of Preventive Veterinary Medicine,
Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário, PO Box 6001, 86051-990, Londrina, Paraná, Brazil.

Tel.: 55 43 3348 5997; fax: 55 43 3348 5997.

E-mail address: alinebarry@uol.com.br

Abstract

Sapovirus (SaV) is one genus within *Caliciviridae* family that also includes *Vesivirus*, *Lagovirus* and *Norovirus* (NoV). SaV and NoV are emerging enteric pathogens that cause diarrhea in humans and animals. SaV have been classified into seven genogroups and GIII, GVI and GVII which prototype is Cowden, JJ681 and K7/JP strains respectively, infect pigs. The objective of this study was to determine SaV infection frequency, age distribution, association with diarrheic disease, and characterize wild-type circulating strains in Brazil. Stool samples from 113 piglets up to 28 days of age were collected from 34 pig farms located in the States of Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS), Paraná (PR), Santa Catarina (SC), and Rio Grande do Sul (RS), during 2004 and 2005 and were evaluated for enteric calicivirus by RT-PCR assay with primers p289/290, designed to detect the partial polymerase gene. Thirty four (30.1%) samples were positive for SaV and five amplicons were sequenced.

SaVs infection were detected more frequently ($p=0.0001$) in animals between 22 to 28 days of age and in equal frequencies in piglets with and without diarrhea. Phylogenetic analyses of the partial RdRp gene amplified by RT-PCR and other published sequences placed BRA29-MS/04 and BRA52-PR/05 strains into the GIII of SaV genus. BRA04-SC/04, BRA21-RS/04, and BRA37-MG/05 demonstrated reduced identity with the Cowden strain but were more closely related (86.3%) to the Japanese and Netherlanders SaV strains. The frequency of SaV detected in this study provides evidence that this virus circulates in Brazilian pig herds. Furthermore, Brazilian SaV strains had high genetic variability.

Keywords: Swine, Piglets, Diarrhea, Calicivirus, *Sapovirus*

INTRODUCTION

Sapovirus (SaV) is classified as one genus within *Caliciviridae* family, which also includes *Vesivirus* (feline calicivirus and vesicular exanthema of swine virus), *Lagovirus* (rabbit hemorrhagic disease virus and European brown hare syndrome virus), and *Norovirus* (NoV) (ICTVdB, 2007). SaV and NoV are an important cause of non-bacterial gastroenteritis in children and adults respectively, although SaV was also related with diarrhea in adults (Noel et al., 1997). Members of this family have 27 to 39 nm in diameter, and small round structure, as NoV and lagovirus, or classic cup-shaped morphology, as SaV and vesivirus (Clarke and Lambden, 1997; Green et al., 2000).

The genome of SaV consists of 7.3 to 7.5 kb of single-stranded poly-adenylated RNA with positive polarity and is divided in two open reading frames (ORF). The ORF1 encodes one polypeptide that was cleaved in all non-structural proteins including RNA dependent RNA polymerase (RdRp). In the same ORF the major capsid protein is also encoded, while the minor structural protein is translated in ORF2 (Clarke and Lambden, 2000). Based on the capsid gene, SaV can be classified in five genogroups: GI, GII, GIV and GV that infect

humans, and GIII that infect pigs (Farkas et al., 2004). Although the same classification was verified by Schuffenecker et al. (2001) comparing distances between SaVs strains in RdRp, 3'ORF, capsid overlap, 3'UTR, and capsid. The prototype of GIII is Cowden strain which causes diarrhea and intestinal lesions in gnotobiotic pigs (Guo et al., 1999, 2001). Whereas the four humans genogroups are well established only recently, a few studies describes the existence of more than one porcine genogroup. They had significantly low identity with GIII members and were called GVI within JJ681 was the main strain and GVII which includes K7 and LL26 strains (Yin et al., 2006; Wang et al., 2005; Wang et al., 2007).

SaV infections showed high prevalence (41.7% and 62%) in pigs with and without clinical signs of diarrhea in some countries (Wang et al., 2006; Yin et al., 2006). To investigate further the frequency of porcine enteric calicivirus, stool samples from piglets were collected in Brazilian swine farms and analyzed by RT-PCR assay. Additionally, the molecular and phylogenetic analyses were performed to characterize wild-type SaVs strains circulating in Brazilian swine herds.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. Fecal samples were collected from 113 piglets in 34 swine farms during 2004 and 2005. The farms were located in the States of Minas Gerais (MG, $n=17$), Mato Grosso do Sul (MS, $n=18$), Paraná (PR, $n=27$), Santa Catarina (SC, $n=25$), and Rio Grande do Sul (RS, $n=26$); these States represent three distinct geographical regions of Brazil (Center West [MS], Southeast [MG], and South [PR, SC, RS]). Age of animals ranged from 1 to 28 days. Specimens were obtained from healthy ($n=31$) and piglets with diarrhea ($n=82$) and were maintained at -20°C until processing. Fecal suspensions were prepared at 10% (w/v) in 0.01M phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2 (137mM NaCl; 3mM KCl; 8mM Na_2HPO_4 ; 15mM KH_2PO_4) and centrifuged at $3000\times g$ for 15 min at 4°C .

RNA extraction. Aliquots of 400 μ l from fecal suspensions were treated with SDS to a final concentration of 1% (v/v), homogenized by vortexing and maintained at 56°C for 30 min. For RNA extraction a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol and silica/guanidinium isothiocyanate methods was performed according to Barreiros et al. (2004) with slight modifications. Briefly, 400 μ l of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) were added, vortexed and heated at 56°C for 15 min (Sambrook et al., 1989). The mixture was centrifuged at 10,000 \times g for 10 min and the supernatant was transferred into a new tube and processed by the silica/guanidinium isothiocyanate method (Boom et al., 1990). The RNA was eluted from the silica pellet with 50 μ l of ultrapure (MilliQ®) RNase free sterile water by 15 min incubation at 56°C and centrifugation at 10,000 \times g for 10 min. The supernatant fraction was maintained at -20°C until use. Aliquots of ultrapure sterile water were included as negative controls in all RNA extraction procedures. As positive control for SaV, a 331 bp length fragment from a strain with high similarity to the Cowden strain was used, and for the NoVs strains a 319 bp length product from a human strain previously identified by RT-PCR and electron microscopy.

RT-PCR. The reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR) assay were performed using primers p289 (5'-TGACAATGTAATCATCACCATA-3') and p290 (5'- GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC-3') designed by Jiang et al. (1999) based on partial RdRp sequence from NoVs and SaVs. To perform the RT, 5 μ l of extracted RNA, 1 μ l (20 pmol) of the reverse primer p289 and ultra pure RNase free water, in a total volume of 10 μ l, was incubated at 97°C for 5 min. Subsequently, it was placed on ice for 5 min, and 10 μ l of the RT mix containing 1 \times RT buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.3, 3mM MgCl₂, 75mM KCl), 0.1mM of each dNTP (Invitrogen™, USA), 10mM DTT, 100 units of M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™, USA) and ultrapure sterile water were added to a final volume of 20 μ l followed by incubation at 42°C for 30 min and enzyme inactivation at 95°C for 5 min.

For the PCR amplification, 8 μ l of the RT reaction were added to 42 μ l of the PCR mix consisting of 1.5 \times PCR buffer (30mM Tris-HCl pH 8.4 and 75mM KCl), 2mM MgCl₂, 0.2mM of each dNTP, 1 μ l (20 pmol) of each primer (p289 reverse/ p290 forward), 2.5 units *Platinum Taq* DNA polymerase (InvitrogenTM, USA) and ultrapure RNase free water to a final volume of 50 μ l. The reaction was performed in a thermocycler (PTC-200, MJ Research Co. Water Town, MA, USA) and included one step at 94°C for 3 min, 40 cycles at 94°C for 30 s, 49°C for 1 min 20 s and 72°C for 1 min, and a final step at 72°C for 10 min.

The expected size of the amplicons were 319 or 331 bp fragment of NoV or SaV, respectively, were analyzed by electrophoresis in a 2% agarose gel in TBE buffer pH 8.4 (89mM Tris; 89mM boric acid; 2mM EDTA), ethidium bromide (0.5 μ g/ml) stained and visualized under UV light.

Sequencing. Purification was performed from PCR product with GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, USA), then quantified with 2% agarose gel using Low DNA Mass Ladder (InvitrogenTM, USA). MegaBACETM 1000 and Thermo SequenaseTM II DNA Polymerase, DYEnamicTM ET Dye Terminator Kit (GE Healthcare, USA) were used for sequencing, this being done in both directions using the forward and reverse primers.

Sequence analysis. Sequences were analyzed with software Sequence Analyzer and Base Caller Cimarron 3.12. Sequence editing was performed with Phred and CAP3 softwares (<http://genoma.cenargen.embrapa.br/phph/>). Translation and verification of the conserved motifs were done by Gene Runner version 3.05. Homology searches were carried using the National Center for Biotechnology information databases and the basic analysis was done in BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) followed by a multiple alignment with CLUSTAL W (version1.4) and sequence identity matrix at BioEdit v7.0.5.3. Phylogenetic tree was constructed by neighbor-joining method with Kimura 2-parameter model, using Mega v3.1 software.

Statistical analysis. Data analyses were performed by *chi square* (χ^2) or Fisher exact with confidence limits of 95%, $p < 0.005$ in EpiInfo version 3.3.2.

RESULTS

SaV amplicon with 331bp was found in 30.1% (34/113) of stool samples, representing 52.9% (18/34) of different swine farms from all five Brazilian States included in the study. Diarrhea was not observed in all animals infected with SaVs. The frequency of the infection was 35.5% and 28.0% ($p=0.59$) for healthy and diarrheic animals, respectively. When the age range was analyzed, the group of 22 to 28 days-old piglets was significantly different ($p=0.0001$) in comparison to other groups (Table 1). The expected 319 bp amplicon of NoV was not detected in any stool sample evaluated.

From the 34 SaV positive samples, one sample from each State was sequenced to confirm the specificity of the RT-PCR results and to characterize wild-type SaV strains circulating within the five Brazilian States. Preliminary results from the five strains performed by BLAST revealed high similarity with the RdRp gene of porcine enteric caliciviruses (data not shown). Before proceed with the analysis, sequences were translated and the presence of the conserved motifs of RdRp gene, GLPSG and YGDD, was verified. In order to characterize the sequences, BRA04-SC/04, BRA21-RS/04, BRA29-MS/04, BRA37-MG/05 and BRA52-PR/04 were aligned with strains representing the four calicivirus genera, including Nebraska strain that did not belong to any of these four genera and was not yet classified. All sequences demonstrated high identity with SaV genus during this analysis. The sequences were than aligned with the nine prototypes of all clusters from the five genogroups and the two new porcine genogroups of SaV (fragment of 286 nt and 95 aa). Strain BRA29-MS/04 had 87% and 97.8% of nucleotide and amino acid identity with Cowden, respectively. BRA52-PR/04 sequence revealed 90.9% of nucleotide identity and 94.7% of amino acid similarity with

Cowden strain. They were also very similar (nt) with Venezuelan, Korean and new described American strains including MM280 a recombinant strain which the RdRp from pattern strain could not be identified (Table 2) (Wang et al., 2005; Martínez et al., 2006; Kim et al., 2006). Whereas BRA04-SC/04, BRA21-RS/04 and BRA37-MG/05 sequences, had nucleotide identities lower than 55% with the Cowden strain. When compared to the two new porcine genogroups GVI (JJ681) and GVII (K7/JP) the three Brazilian strains demonstrated higher nucleotides homology (59.8 to 63.4) with them, but not high enough to belong to the same genogroup (Table 2).

In the neighbor-joining phylogenetic tree based on 287 nucleotides from RdRp, BRA29-MS/04 and BRA52-PR/04 was placed into GIII while BRA04-SC/04, BRA21-RS/04 and BRA37-MG/05 clearly formed a different cluster (Fig.1).

All stool samples tested for SaV were evaluated by PAGE for the presence of rotavirus being 19.5% (22/113) positives. Despite of Ludert et al. (2004), that the p289/290 primers also detect rotavirus by cross-reactivity, the five RT-PCR amplicons sequenced were effectively SaVs.

DISCUSSION

Sapoviruses were detected in 30.1% of piglets stool samples from 113 evaluated by RT-PCR assay, indicating that this virus is present in feces of piglets from Brazilian swine farms. These results confirm data from other countries where the frequency of SaV infection were relatively high (Wang et al., 2006; Yin et al., 2006). On the other hand, noroviruses were not detected in any sample tested with the p289/290 primers. Farkas et al. (2005) describes similar result when testing 104 fecal samples and 13 intestinal contents from pigs up to 3 months and with 6 to 12 months of age, respectively, in which no NoV was detected. The author suggests that the p289/290 primers limitations detecting swine NoV, presence of

inhibitors factors in pigs feces, and low number of diarrheic stool samples used in the study might explain these results. In the present study, the age of the animals was another significant fact, because any sample from piglets older than 28 days was included and the higher prevalence of NoV infection occurs in finisher pigs (Wang et al., 2006).

Statistical analysis demonstrated association ($p=0.0001$) between the age of piglets and SaV infection, where the predominantly age group with the presence of the virus was 22 to 28-days-old. This age predominance may be related to the postweaning period, in which the animals were stressed due to feeding, environmental, and social alterations; additionally, during this, maternal antibodies are decreased and the piglets are more susceptible to infections.

When compared with healthy or piglets with diarrhea, the proportion of positive samples was not significantly different ($p=0.59$). Similar results were also described in another study (Martínez et al., 2006); therefore more research must be done to verify the association of the SaV and the development of enteric disease in pigs. However, in experimental infections with the porcine enteric calicivirus prototype, the Cowden strain, the virus induced severe intestinal lesions (Guo et al., 2001). In the current study, the seven samples that were positive for SaV in animals ranging from 1 and 2 weeks-old, were detected in diarrheic samples, but there was no statistical association between the infection and disease ($p=0.325$).

Molecular analyses of the partial RdRp amplified by RT-PCR assay and other published sequences, indicated that the five Brazilian strains were SaV. Within the genus BRA29-MS/04 and BRA52-PR/04 revealed elevate sequence identity with the Cowden, Venezuelan, Korean and new described American strains, being classified as GIII members. The identity between BRA04-SC/04, BRA21-RS/04, BRA37-MG/05 sequences and sapoviruses prototypes, including the Cowden, JJ681 and K7/JP strains, was not enough to classify these sequences into any of the seven SaV genogroups. Although, they demonstrated up to 86.3%

nucleotide identity with Japanese (other than K7/JP) and Netherlands strains that also could not be classified into SaV GIII (data not shown).

The dendrogram reconstruction placed BRA29-MS/04 and BRA52-PR/04 into GIII of SaV genus. On the other hand, BRA04-SC/04, BRA21-RS/04, BRA37-MG/05, Japanese and Netherlands strains was organized into a new cluster (GVIII? - a putative different cluster that includes porcine strains with low identity with GIII, GVI and GVII members) that was less distant from GVI, which includes JJ681, and GVII, with K7/JP and LL26, but clearly a different group (Fig.1).

Besides the fragment amplified from Brazilian strains was relatively short to characterize a genogroup, the low homology with published sequences in the RdRp gene, which was expected to be more conserved than the capsid gene, was a very important indication that these sequences, including the Japanese and Netherlands, compose a new genogroup. However, other studies relative to the entire virus genome or, at least, a larger product enclosing other proteins of these strains such as the capsid protein gene, will be undertaken.

In summary, porcine enteric caliciviruses with high frequency in Brazilian swine herds from the main pig producing areas were detected, confirming that PECs were circulating in Brazil principally in postweaning pigs. Further studies are needed to elucidate the role of the Brazilian SaV strains in the pathogenesis of diarrhea, including those strains that demonstrated lower identity with the Cowden strain (GVIII?). The frequency of GVIII? strains detection also need to be evaluated even so it apparently occurs in three different continents: America (Brazil), Asia (Japan), and Europe (Netherlands).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank to the Brazilian Institutes CNPq, CAPES, FINEP and Fundação Araucária for financial support. Alfieri, A.A. and Alfieri, A.F. are recipient of CNPq fellowships.

REFERENCES

- Barreiros, M.A.B., Alfieri, A.F., Médici, K.C., Leite, J.P.G., Alfieri, A.A., 2004. G and P genotypes of group A rotavirus from diarrhoeic calves born to cows vaccinated against the NCDV (P[1], G6) rotavirus strain. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 51, 104–109.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M.E., van der Noordaa J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495-503.
- Clarke, I.N., Lambden, P.R., 1997. The molecular biology of caliciviruses. *Journal of General Virology* 78, 291-301.
- Clarke, I.N., Lambden, P.R., 2000. Organization and expression of calicivirus genes. *The Journal of Infectious Diseases* 181, 309-316.
- Farkas, T., Zhong, W.M., Jing, Y., Huang, P.W., Espinosa, S.M., Martinez, N., Morrow, A.L., Ruiz-Palacios, G.M., Pickering, L.K., Jiang, X., 2004. Genetic diversity among sapoviruses. *Archives of Virology* 149, 1309-1323.

- Farkas, T., Nakajima, S., Sugieda, M., Deng, X., Zhong, W., Jiang, X., 2005. Seroprevalence of noroviruses in swine. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 657-661.
- Green, K.Y., Ando, T., Balayan, M.S., Berke, T., Clarke, I.N., Estes, M.K., Matson, D.O., Nakata, S., Neill, J.D., Studdert, M.J., Thiel, H.J., 2000. Taxonomy of the caliciviruses. *The Journal of Infectious Diseases* 181, 322-330.
- Guo, M., Chang, K.O., Hardy, M.E., Zhang, Q., Parwani, A.V., Saif, L.J., 1999. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. *Journal of Virology* 73, 9625-9631.
- Guo, M., Hayes, J., Cho, K.O., Parwani, A.V., Lucas, L.M., Saif, L.J., 2001. Comparative pathogenesis of tissue cultured-adapted and wild-type Cowden porcine enteric calicivirus (PEC) in gnotobiotic pigs and induction of diarrhea by intravenous inoculation of wild-type PEC. *Journal of Virology* 75, 9239-9251.
- ICTVdB – The Universal Virus Database, version 4.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/>> . Access in: jan. 25th 2007.
- Jiang, X., Huang, P.W., Zhong, W.M., Farkas, T., Cubitt, D.W., Matson, D.O., 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 83, 145-154.
- Kim, H.J., Cho, H.S., Cho, K.O., Park, N.Y., 2006. Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. *Journal of*

Veterinary Medicine Series B Infectious Diseases and Veterinary Public Health 53, 155-159.

Ludert, J.E, Alcalá, A.C., Liprandi, F., 2004. Primer pair p289-p290, designed to detect both noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR, also detects rotaviruses by cross-reactivity. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 835-836.

Martínez, M.A., Alcalá, A.C., Carruyo, G., Botero, L., Liprandi, F., Ludert, J.E., 2006. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. *Veterinary Microbiology* 116, 77-84.

Noel, J.S., Liu, B.L., Humphrey, C.D., Rodriguez, E.M., Lambden, P.R., Clarke, I.N., Dwyer, D.M., Ando, T., Glass, R.I., Monroe, S.S., 1997. Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *Journal of Medical Virology* 52, 173-178.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Schuffenecker, I., Ando, T., Thouvenot, D., Lina, B., Aymard, M., 2001. Genetic classification of "Sapporo-like viruses". *Archives of Virology* 146, 2115-2132.

Wang, Q.W., Han, M.G., Funk, J.A., Bowman, G., Janies, D.A., Saif, L.J., 2005. Genetic diversity and recombination of porcine sapoviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5963-5972.

Wang, Q.W., Souza, M., Funk, J.A., Zhang, W., Saif, L.J., 2006. Prevalence of noroviruses and sapoviruses in swine of various ages determined by reverse transcription-PCR and microwell hybridization assays. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2057-2062.

Wang, Q.W., Costantini, V., Saif, L.J., 2007. Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. *Vaccine*. *In press*.

Yin, Y., Tohya, Y., Ogawa, Y., Numazawa, D., Kato, K., Akashi, H., 2006. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. *Archives of Virology* 151, 1749-1759.

Table 1. Frequency of sapovirus detection by RT-PCR assay in stool samples from healthy and diarrheic piglets distributed according age groups

Age (days)	positives/tested samples (%)		
	diarrheic	non-diarrheic	total
01-07	6/30 (20.0)	0/5	6/35 (17.1)
08-14	1/15 (6.7)	0/7	1/22 (4.5)
15-21	4/22 (18.2)	3/9 (33.3)	7/31 (22.6)
22-28	12/15 ^a (80.0)	8/10 ^a (80.0)	20/25 ^a (80.0)
Total	23/82 ^b (28.0)	11/31 ^b (35.5)	34/113 (30.1)

a (p=0.0001)

b (p=0.59)

Table 2. Nucleotide identity matrix from partial RdRp region (304 nt) between wild-type Brazilian strain and other porcine enteric calicivirus strains

Accession number	Strain	Origin	BRA04	BRA21	BRA29	BRA37	BRA52	Cowden	LL14	JJ681	K7/JP	LL26	QW19	MM280	JJ259	Korean	Miranda	SWECIII
EF183478	BRA04-SC/04	Brazil	ID	0,582	0,519	0,642	0,528	0,513	0,509	0,619	0,602	0,539	0,496	0,513	0,519	0,44	0,463	0,625
EF183479	BRA21-RS/04	Brazil	0,582	ID	0,521	0,803	0,513	0,495	0,504	0,614	0,634	0,548	0,478	0,514	0,488	0,408	0,481	0,78
EF183480	BRA29-MS/04	Brazil	0,519	0,521	ID	0,495	0,887	0,863	0,883	0,544	0,518	0,435	0,574	0,764	0,823	0,73	0,827	0,478
EF183481	BRA37-MG/05	Brazil	0,642	0,803	0,495	ID	0,509	0,481	0,491	0,634	0,598	0,574	0,481	0,521	0,501	0,418	0,465	0,82
EF183482	BRA52-PR/04	Brazil	0,528	0,513	0,887	0,509	ID	0,897	0,903	0,552	0,519	0,45	0,582	0,738	0,811	0,764	0,857	0,486
AF182760	Cowden	USA	0,513	0,495	0,863	0,481	0,897	ID	0,973	0,551	0,508	0,445	0,578	0,77	0,84	0,827	0,873	0,461
AY425671	LL14	USA	0,509	0,504	0,883	0,491	0,903	0,973	ID	0,538	0,504	0,441	0,588	0,757	0,84	0,813	0,873	0,458
AY974192	JJ681	USA	0,619	0,614	0,544	0,634	0,552	0,551	0,538	ID	0,667	0,598	0,485	0,544	0,548	0,468	0,504	0,614
AB221130	K7/JP	Japan	0,602	0,634	0,518	0,598	0,519	0,508	0,504	0,667	ID	0,823	0,465	0,528	0,514	0,425	0,455	0,574
AY974195	LL26	USA	0,539	0,548	0,435	0,574	0,45	0,445	0,441	0,598	0,823	ID	0,472	0,468	0,445	0,378	0,461	0,538
AY826424	QW19	USA	0,496	0,478	0,574	0,481	0,582	0,578	0,588	0,485	0,465	0,472	ID	0,571	0,564	0,498	0,615	0,455
AY823308	MM280	USA	0,513	0,514	0,764	0,521	0,738	0,77	0,757	0,544	0,528	0,468	0,571	ID	0,747	0,657	0,704	0,478
AY826423	JJ259	USA	0,519	0,488	0,823	0,501	0,811	0,84	0,84	0,548	0,514	0,445	0,564	0,747	ID	0,727	0,777	0,468
AY289186	Korean 6802	Korea	0,44	0,408	0,73	0,418	0,764	0,827	0,813	0,468	0,425	0,378	0,498	0,657	0,727	ID	0,734	0,408
AY633963	Miranda/2000	Venezuela	0,463	0,481	0,827	0,465	0,857	0,873	0,873	0,504	0,455	0,461	0,615	0,704	0,777	0,734	ID	0,421
AY615812	SWECIII/VA24a	Netherlands	0,625	0,78	0,478	0,82	0,486	0,461	0,458	0,614	0,574	0,538	0,455	0,478	0,468	0,408	0,421	ID

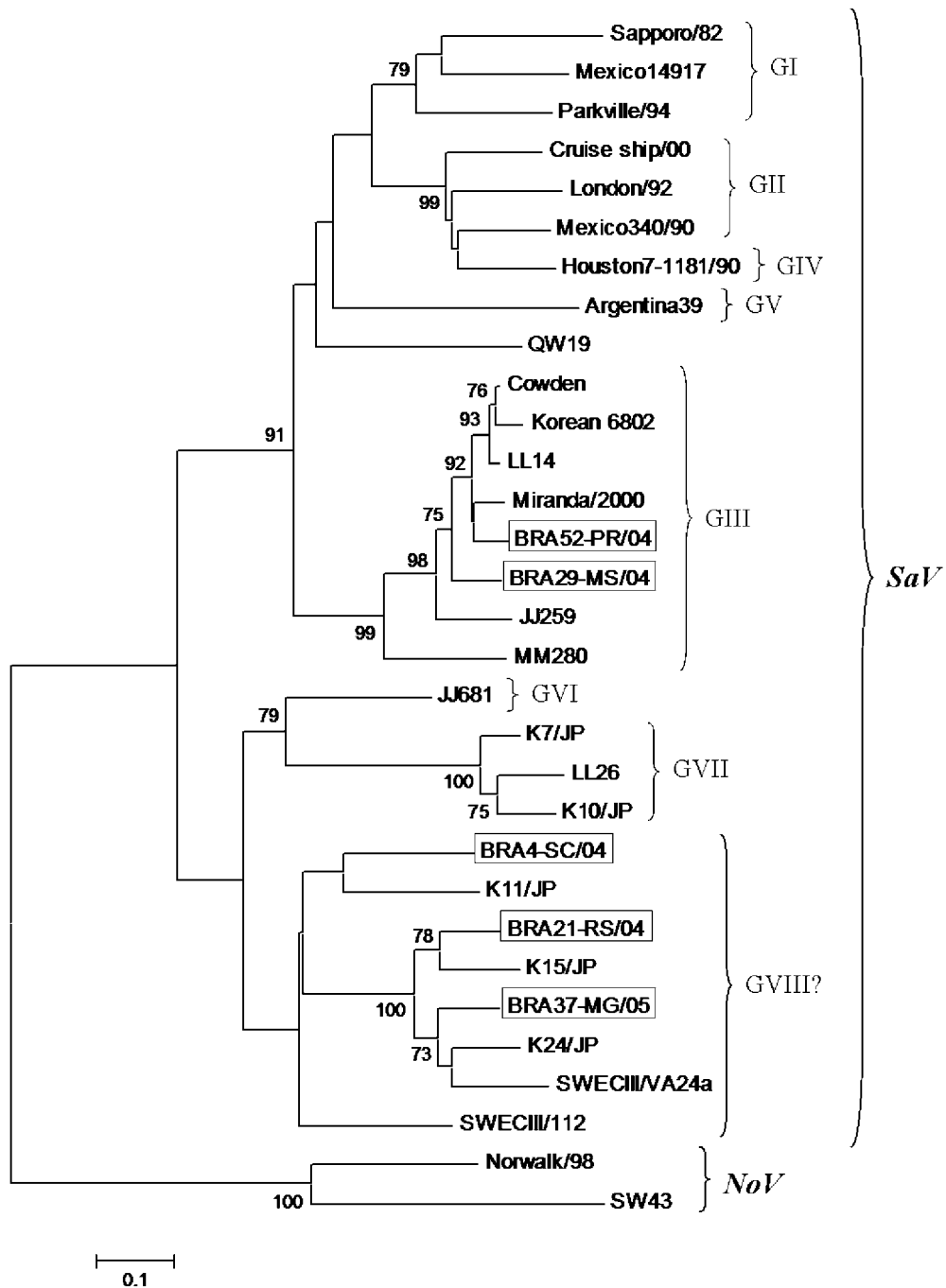


Fig.1. Neighbor-joining phylogenetic tree (1000 replicates) based on the partial RdRp gene (287 nt) from published SaVs and Brazilian strains. Sequences used in the alignment were acquired from GenBank as follows accession numbers: Sapporo/82 (U65427), Mexico14917 (AF435810), Parkville/94 (U73124), Cruise ship/00 (AY157863), London/92 (U95645), Mexico340/90 (AF435809), Houston7-1181/90 (AF435811), Argentina39 (AF405715), QW19 (AY826424), Cowden (AF182760), Korean6802 (AY289186), LL14 (AY425671), Miranda/2000 (AY633963), BRA52-PR/04 (EF183482), BRA29-MS/04 (EF183480), JJ259 (AY826423), MM280 (AY823308), JJ681 (AY974192), K7/JP (AB221130), LL26 (AY974195), K10/JP (AB221131), BRA04-SC/04 (EF183478), K11/JP (AB223000), BRA21-RS/04 (EF183479), K15/JP (AB223002), BRA37-MG/05 (EF183481), K24/JP (AB223005), SWECIII/VA24a (AY615812), SWECIII/112 (AY615814), Norwalk/98 (M87661) and SW43 (AB074893).

4 CONCLUSÕES

- A RT-PCR para a detecção do sapovírus suíno otimizada nesse estudo possibilitou a amplificação de um fragmento de 331 pb, a partir de amostras de fezes de leitões abrindo a perspectiva de sua utilização para a o diagnóstico da infecção em suínos;
- A infecção de leitões pelo sapovírus suíno esta amplamente disseminada nos rebanhos suínos brasileiros estudados;
- Na amostragem de fezes de leitões analisada não houve associação entre a presença do sapovírus e o quadro clínico de diarreia;
- A taxa de infecção pelo sapovírus em leitões recém-desmamados foi significativamente superior ($p < 0,05$) à observada nos outros grupos etários avaliados, constituídos por animais lactentes;
- Além da identificação de estirpes brasileiras de sapovírus suíno, semelhantes ao protótipo Cowden (genogrupo III) na região do gene da RNA polimerase, foi possível também a caracterização da ampla variabilidade genética das estirpes circulantes no Brasil, sugerindo a possibilidade da existência de um novo genogrupo no gênero *Sapovirus*.

REFERÊNCIAS

ADLER, J.L.; ZICKL, R. Winter vomiting disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v.119, p.668-673, 1968.

ALMEIDA, J.D.; CRAIG, C.R.; HALL, T.E. Multiple viruses present in the faeces of a scouring calf. **The Veterinary Record**, v.102, n.8, p.170-171, 1978.

ANDO, T.; NOEL, J.S.; FRANKHAUSER, R.L. Genetic Classification of “Norwalk-like Viruses”. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.336-348, 2000.

ATMAR, R.L.; ESTES, M.K. Diagnosis of Noncultivable Gastroenteritis Viruses, the Human Caliciviruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.1, p.15-37, 2001.

BASCUÑANA, C.R.; NOWOTNY, N.; BELÁK, S. Detection and Differentiation of Rabbit Hemorrhagic Disease and European Brown Hare Syndrome Viruses by Amplification of VP60 Genomic Sequences from Fresh and Fixed Tissue Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.10, p.2492-2495, 1997.

BELLIOT, G.; SOSNOVTSEV, S.V.; MITRA, T.; HAMMER, C.; GARFIELD, M.; GREEN, K.Y. In Vitro Proteolytic Processing of the MD145 Norovirus ORF1 Nonstructural Polyprotein Yields Stable Precursors and Products Similar to Those Detected in Calicivirus-Infected Cells. **Journal of Virology**, v.77, n.20, p.10957-10974, 2003.

BURROUGHS, J.N.; BROWN, F. Physico-chemical Evidence for the Re-classification of the Caliciviruses. **Journal of General Virology**, v.22, p.281-286, 1974.

CLARKE, I.N.; LAMBDEN, P.R. Organization and Expression of Calicivirus Genes. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.309-316, 2000.

COSTANTINI, V.C.; LOISY, F.; JOENS, L.; LE GUYADER, F.S.; SAIF, L.J. Human and Animal Enteric Calicivirus in Oysters from Different Coastal Regions of the United States. **Applied and Environmental Virology**, v.72, n.3, p.1800-1809, 2006.

CUBITT, W.D. Caliciviruses. In: KAPIKIAN, A.Z. **Viral Infection of the Gastrointestinal Tract**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1994. p.549-568.

CENTERS for Disease Control and Prevention (CDC). Norovirus outbreak among evacuees from hurricane Katrina - Houston, Texas, September 2005. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.54, p.1016-1018, 2005.

CHANG, K.O.; SOSNOVTSEV, S.V.; BELLLOT, G.; KIM, Y.; SAIF, L.J.; GREEN, K.Y. Bile acids are essential for porcine enteric calicivirus replication in association with down-regulation of signal transducer and activator of transcription 1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.101, n.23, p.8733-8738, 2004.

CHIBA, S.; NAKATA, S.; NUMATA-KINOSHITA, K.; HONMA, S. Sapporo Virus: History and Recent Findings. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.303-308, 2000.

DASTJERDI, A.M.; GREEN, J.; GALLIMORE, C.I.; BROWN, D.W.G.; BRIDGER, J.C. The Bovine Newbury Agent-2 Is Genetically More Closely Related to Human SRSVs Than to Animal Caliciviruses. **Virology**, v.254, p.1-5, 1999.

DUIZER, E.; SCHWAB, K.J.; NEILL, F.H.; ATMAR, R.L.; KOOPMANS, M.P.G.; ESTES, M.K. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. **Journal of General Virology**, v.85, p.79-87, 2004.

EHRESMANN, D.W.; SCHAFFER, F.L. RNA Synthesized in Calicivirus-Infected Cells Is Atypical of Picornaviruses. **Journal of Virology**, v.22, n.2, p.572-576, 1977.

FARKAS, T.; ZHONG, W.M.; JING, Y.; HUANG, P.W.; ESPINOSA, S.M.; MARTINEZ, N.; MORROW, A.L.; RUIZ-PALACIOS, G.M., Pickering, L.K., Jiang, X. Genetic diversity among sapoviruses. **Archives of Virology**, v.149, p.1309-1323, 2004.

FARKAS, T.; NAKAJIMA, S.; SUGIEDA, M.; DENG, X.; ZHONG, W.; JIANG, X. Seroprevalence of Noroviruses in Swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.657-661, 2005.

FASTIER, L.B. A new feline virus isolated in tissue culture. **American Journal of Veterinary Research**, v.18, n.67, p.382-389, 1957.

FLYNN, W.T.; SAIF, L.J. Serial Propagation of Porcine Enteric Calicivirus-Like Virus in Primary Porcine Kidney Cell Culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.2, p.206-212, 1988.

FLYNN, W.T.; SAIF, L.J.; MOORHEAD, P.D. Pathogenesis of porcine enteric calicivirus-like virus in four-day-old gnotobiotic pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, n.6, p.819-825, 1988.

FRANKHAUSER, R.L.; NOEL, J.S.; MONROE, S.S.; ANDO, T.; GLASS, R.I. Molecular Epidemiology of “Norwalk-like Viruses” in Outbreaks of Gastroenteritis in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v.178, p.1571–1578, 1998.

FRANKHAUSER, R.L.; MONROE, S.S.; NOEL, J.S.; HUMPHREY, C.D.; BRESSE, J.S.; PARASHAR, U.D.; ANDO, T.; GLASS, R.I. Epidemiologic and Molecular Trends of “Norwalk-like Viruses” Associated with Outbreaks of Gastroenteritis in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p.1–7, 2002.

GALLIMORE, C.I.; BARREIROS, M.A.B.; BROWN, D.W.G.; NASCIMENTO, J.P.; LEITE, J.P.G. Noroviruses associated with acute gastroenteritis in a children’s day care facility in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.321-326, 2004.

GOUGH, R. E.; SPACKMAN, D. Virus-like particles associated with disease in guinea fowl. **The Veterinary Record**, v.109, n.22, p.497, 1981.

GREEN, K.Y.; ANDO, T.; BALAYAN, M.S.; BERKE, T.; CLARKE, I.N.; ESTES, M.K.; MATSON, D.O.; NAKATA, S.; NEILL, J.D.; STUDDERT, M.J.; THIEL, H.J. Taxonomy of the Caliciviruses. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.322-330, 2000.

GREENBERG, H.B.; VALDESUSO, J.R.; KALIKA, A.R.; WYATT, R.G.; McAULIFFE, V.J.; KAPIKIAN, A.Z.; CHANOCK, R.M. Proteins of Norwalk virus. **Journal of Virology**, v.37, p.994-999, 1981.

GUO, M.; CHANG, K.O.; HARDY, M.E.; ZHANG, Q.; PARWANI, A.V.; SAIF, L.J. Molecular characterization of a porcine enteric calicivirus genetically related to Sapporo-like human caliciviruses. **Journal of Virology**, v.73, n.11, p.9625-9631, 1999.

GUO, M.; EVERMANN, J.F.; SAIF, L.J. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. **Archives of Virology**, v.146, n.3, p.479-493, 2001.

HANSMAN, G.S.; TAKEDA, N.; KATAYAMA, K.; TU, E.T.V.; McIVER, C.J.; RAWLINSON, W.D.; WHITE, P.A. Genetic Diversity of Sapovirus in Children, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.1, p.141-143, 2006.

ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>> . Acesso em: 21 jan. 2007.

INOUYE, S.; YAMASHITA, K.; YAMADERA, S.; YOSHIKAWA, M.; KATO, N.; OKABE, N. Surveillance of Viral Gastroenteritis in Japan: Pediatric Cases and Outbreak Incidents. **The Journal of Infectious Diseases**, v.181, p.270-274, 2000.

ISAKBAEVA, E.T.; WIDDOWSON, M.A.; BEARD, R.S.; BULENS, S.N.; MULLINS, J.; MONROE, S.S.; BRESEE, J.; SASSANO, P.; CRAMER, E.H.; GLASS, R.I. Norovirus Transmission on Cruise Ship. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.1, p.154-157, 2005.

JIANG, X.; HUANG, P.W.; ZHONG, W.M.; FARKAS, T.; CUBITT, D.W.; MATSON, D.O. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.83, p.145-154, 1999.

KAPIKIAN, A.Z.; WYATT, R.G.; DOLIN, R.; THORNHILL, T.S.; KALICA, A.R.; CHANOCK, R.M. Visualization by Immune Electron Microscopy of a 27-nm Particle Associated with Acute Infectious Nonbacterial Gastroenteritis. **Journal of Virology**, v.10, n.5, p.1075-1081, 1972.

KARST, S.M.; WOBUS, C.E.; LAY, M.; DAVIDSON, J.; VIRGIN IV, H.W. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. **Science**, v.299, p.1575-1578, 2003.

KIM, H.J.; CHO, H.S.; CHO, K.O.; PARK, N.Y. Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. **Journal of Veterinary Medicine Series B Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.53, p.155-159, 2006.

LAVAZZA, A.; VECCHI, G. Osservazioni su alcuni episodi di mortalità nella lepre: evidenziazione al microscopio elettronico di una particella virale. Nota preliminare. **Estr. Sel. Vet.**, v.30, p.461-468, 1989.

LONG, G.G.; EVERMANN, J.F.; GORHAM, J.R. Naturally occurring picornavirus infection of domestic mink. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.44, p.412-417, 1980.
LOPMAN, B.A.; REACHER, M.H.; van DUIJNHOFEN, Y.; HANON, F.X.; BROWN, D.; KOOPMANS, M. Viral Gastroenteritis Outbreaks in Europe, 1995-2000. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.1, p.90-96, 2003.

LIU, B.L.; LAMBDEN, P.R.; GÜNTNER, H.; OTTO, P.; ELSCHNER, M.; CLARKE, I.N. Molecular Characterization of a Bovine Enteric Calicivirus: Relationship to the Norwalk-Like Viruses. **Journal of Virology**, v.73, n.1, p.819-825, 1999.

LIU, S.J.; XUE, H.P.; PU, B.Q.; QIAN, N.H. A new viral disease in rabbits. **Animal Husbandry and Veterinary Medicine**, v.16, p.253–255, 1984.

MADELEY, C.R.; COSGROVE, B.P. Letter: caliciviruses in man. **Lancet**, i:199-200, 1976.

MADIN, S.H.; TRAUM, J. Vesicular Exanthema of Swine. **Bacteriological Reviews**, v.19, n.1, p.6-21, 1955.

MARTIN-ALONSO, J.M.; SKILLING, D.E.; GONZALEZ-MOLLEDA, L.; del BARRIO, G.; MACHIN, A.; KEEFER, N.K.; MATSON, D.O.; IVERSEN, P.L.; SMITH, A.W.; PARRA, F. Isolation and characterization of a new Vesivirus from rabbits. **Virology**, v.337, n.2, p.373-383, 2005.

MARTÍNEZ, M.A.; ALCALÁ, A.C.; CARRUYO, G.; BOTERO, L.; LIPRANDI, F.; LUDERT, J.E. Molecular detection of porcine enteric caliciviruses in Venezuelan farms. **Veterinary Microbiology**, v.116, n.1-3, p.77-84, 2006.

MOHLER, J. R.; SNYDER, R. The 1932 outbreak of foot-and-mouth disease in Southern California. **United States Department of Agriculture, Misc. Public**, n.163, p.1-10, 1933.

NAKAMURA, L.S.; OLIVEIRA, D.S.; SILVA, P.F.; LUCENA, M.S.; MASCARENHAS, J.D.P.; GUSMÃO, R.H.P.; LINHARES, A.C.; GABBAY, Y.B. Molecular characterization of calicivirus in feces of children with acute diarrhea, attending a public hospital, in Belém-Pará. In: NATIONAL MEETING OF VIROLOGY, 17., 2006, Campos do Jordão. **Anais...** 2006. p.95.

NEILL, J.D.; MEYER, R.F.; SEAL, B.S. Genetic Relatedness of the Caliciviruses: San Miguel Sea Lion and Vesicular Exanthema of Swine Viruses Constitute a Single Genotype within the *Caliciviridae*. **Journal of Virology**, v.67, n.7, p.4484-4488, 1995.

OHLINGER, V.F.; HAAS, B.; MEYERS, G.; WEILAND, F.; THIEL, H.J. Identification and Characterization of the Virus Causing Rabbit Hemorrhagic Disease. **Journal of Virology**, v.64, n.7, p.3331-3336, 1990.

OKA, T.; KATAYAMA, K.; OGAWA, S.; HANSMAN, G.S.; KAGEYAMA, T.; USHIJIMA, H.; MIYAMURA, T.; TAKEDA, N. Proteolytic Processing of Sapovirus ORF1 Polyprotein. **Journal of Virology**, v.79, n.12, p.7283-7290, 2005.

OKADA, M.; SHINOZAKI, K.; OGAWA, T.; KAIHO, I. Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of Sapporo-like viruses. **Archives of Virology**, v.147, p.1445-1451, 2002.

OKADA, M.; YAMASHITA, Y.; OSETO, M.; SHINOZAKI, K. The detection of human sapoviruses with universal and genogroup-specific primers. **Archives of Virology**, v.151, n.12, p.2503-2509, 2006.

PARWANI, A.V.; FLYNN, W.T.; GADFIELD, K.L.; SAIF, L.J. Serial propagation of porcine enteric calicivirus in a continuous cell line. **Archives of Virology**, v.120, n.1-2, p.115-122, 1991.

REUTER, G.; BÍRÓ, H.; SZÜCS, G. Enteric caliciviruses in domestic pigs in Hungary. **Archives of Virology**, *in press*, 2006.

SAIF, L.J.; BOHL, E.H.; THEIL, K.W.; CROSS, R.F.; HOUSE, J.A. Rotavirus-Like, Calicivirus-Like, and 23-nm Virus-Like Particles Associated with Diarrhea in Young Pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.12, n.1, p.105-111, 1980.

SCHAFFER, F.L.; SOERGEL, M.E.; BLACK, J.W.; SKILLING, D.E.; SMITH, A.W.; CUBITT, W.D. Characterization of a new calicivirus isolated from feces of a dog. **Archives of Virology**, v.84, n.3-4, p.181-195, 1985.

SCHUFFENECKER, I.; ANDO, T.; THOUVENOT, D.; LINA, B.; AYMARD, M. Genetic classification of "Sapporo-like viruses". **Archives of Virology**, v.146, p.2115-2132, 2001.

SEAL, B.S.; LUTZE-WALLACE, C.; KREUTZ, L.C.; SAPP, T.; DULAC, G.C.; NEILL, J.D. Isolation of caliciviruses from skunks that are antigenically and genotypically related to San Miguel sea lion virus. **Virus Research**, v.37, n.1, p.1-12, 1995.

SMITH, A.W.; AKERS, T.G.; MADIN, S.H.; VEDROS, N.A. San Miguel sea lion virus isolation, preliminary characterization and relationship to vesicular exanthema of swine virus. **Nature (London)**, v.244, p.108-110, 1973.

SMITH, A.W.; MATTSON, D.E.; SKILLING, D.E.; SCHMITZ, J.A. Isolation and partial characterization of a calicivirus from calves. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, n.5, p.851-855, 1983a.

SMITH, A.W.; SKILLING, D.E.; ENSLEY, P.K.; BENIRSCHKE, K.; LESTER, T.L. Calicivirus isolation and persistence in a pygmy chimpanzee (*Pan paniscus*). **Science**, v.221, n.4605, p.79-81, 1983b.

SMITH, A.W.; SKILLING, D.E.; RIDGWAY, S. Calicivirus-induced vesicular disease in cetaceans and probable interspecies transmission. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.183, n.11, p.1223-1225, 1983c.

SMITH, A.W.; ANDERSON, M.P.; SKILLING, D.E.; BARLOUGH, J.E.; ENSLEY, P.K. First isolation of calicivirus from reptiles and amphibians. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.8, p.1718-1721, 1986.

SOSNOVTSEV, S.V.; GARFIELD, M.; GREEN, K.Y. Processing Map and Essential Cleavage Sites of the Nonstructural Polyprotein Encoded by ORF1 of the Feline Calicivirus Genome. **Journal of Virology**, v.76 n.14, p.7060-7072, 2002.

SUGIEDA, M.; NAGAOKA, H.; KAKISHIMA, Y.; OHSHITA, T.; NAKAMURA, S.; NAKAJIMA, S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. **Archives of Virology**, v.143, p.1215-1221, 1998.

SUGIEDA, M.; NAKAJIMA, S. Viruses detected in the caecum contents of healthy pigs representing a new genetic cluster in genogroup II of the genus 'Norwalk-like viruses'. **Virus Research**, v.87, p.165-172, 2002.

THUMFART, J.O.; MEYERS, G. Feline Calicivirus: Recovery of Wild-Type and Recombinant Viruses after Transfection of cRNA or cDNA Constructs. **Journal of Virology**, v.76, n.12, p.6398-6407, 2002.

WANG, Q.W.; HAN, M.G.; FUNK, J.A.; BOWMAN, G.; JANIES, D.A.; SAIF, L.J. Genetic Diversity and Recombination of Porcine Sapoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.12, p.5963-5972, 2005.

WANG, Q.W.; CHANG, K.O.; HAN, M.G.; SREEVATSAN, S.; SAIF, L.J. Development of a new microwell hybridization assay and an internal control RNA for the detection of porcine noroviruses and sapoviruses by reverse transcription-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.132, n.1-2, p.135-145, 2006a.

WANG, Q.W.; SOUZA, M.; FUNK, J.A.; ZHANG, W.; SAIF, L.J. Prevalence of Noroviruses and Sapoviruses in Swine of Various Ages Determined by Reverse Transcription-PCR and Microwell Hybridization Assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.6, p.2057-2062, 2006b.

WANG, Q.W.; COSTANTINI, V.; SAIF, L.J. Porcine enteric caliciviruses: Genetic and antigenic relatedness to human caliciviruses, diagnosis and epidemiology. **Vaccine**, *In Press*, 2007.

WILDER, F.W.; DARDIRI, A.H. San Miguel Sea Lion Virus Fed to Mink and Pigs. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.42, n.2, p.200-204, 1978.

WIRBLICH, C.; MEYERS, G.; OHLINGER, V.F.; CAPUCCI, L.; ESKENS, U.; HAAS, B.; THIEL, H.J. European Brown Hare Syndrome Virus: Relationship to Rabbit Hemorrhagic Disease Virus and Other Caliciviruses. **Journal of Virology**, v.68, n.8, p.5164-5173, 1994.

WIRBLICH, C.; THIEL, H.J.; MEYERS, G. Genetic Map of the Calicivirus Rabbit Hemorrhagic Disease Virus as Deduced from In Vitro Translation Studies. **Journal of Virology**, v.70, n.11, p.7974-7983, 1996.

WOBUS, C.E.; KARST, S.M.; THACKRAY, L.B.; CHANG, K.O.; SOSNOVTSEV, S.V.; BELLLOT, G.; KRUG, A.; MACKENZIE, J.M.; GREEN, K.Y.; VIRGIN IV, H.W. Replication of Norovirus in Cell Culture Reveals a Tropism for Dendritic Cells and Macrophages. **PLoS Biology**, v.2, n.12, p.2076-2084, 2004.

WOBUS, C.E.; THACKRAY, L.B.; VIRGIN IV, H.W. Murine Norovirus: a Model System To Study Norovirus Biology and Pathogenesis. **Journal of Virology**, v.80, n.11, p.5104-5112, 2006.

YIN, Y.; TOHYA, Y.; OGAWA, Y.; NUMAZAWA, D.; KATO, K.; AKASHI, H. Genetic analysis of calicivirus genomes detected in intestinal contents of piglets in Japan. **Archives of Virology**, v.151, n.9, p.1749-1759, 2006.

ZHENG, D.P.; ANDO T.; FRANKHAUSER, R.L.; BEARD, R.S.; GLASS, R.I.; MONROE, S.S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. **Virology**, v.346, p.312-323, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A
Lista de Reagentes

1. 2-Mercaptoetanol ($C_2H_6O_5$) P.M. 78,13 (Fluka[®])
2. Acetona, P.A. (CH_3COCH_3) P.M. 58,08 (Dinâmica[®])
3. Ácido acético glacial, P.A. (CH_3COOH) P.M. 60,05 (Nuclear[®])
4. Ácido bórico (H_3BO_3) P.M. 61,83
5. Ácido clorídrico (HCl) P.M. 36,46 (Reagen[®])
6. Ácido etilenodiaminotetraácido Sal di-sódico – EDTA, P.A. ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) P.M. 372,24 (Reagen[®])
7. Agarose (Gibco BRL[®])
8. Álcool etílico absoluto (C_2H_5OH) P.M. 46,07 (Nuclear[®])
9. Álcool isoamílico ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$) P.M. 88,15 (Synth[®])
10. Azul de bromofenol (Sigma[®])
11. Bicarbonato de sódio P.A. ($NaHCO_3$) P.M. 84,01 (Biotec[®])
12. Cloreto de potássio, P.A. (KCl) P.M. 74,56 (Reagen[®])
13. Cloreto de sódio, P.A. (NaCl) P.M. 58,45 (Reagen[®])
14. Clorofórmio, P.A. ($CHCl_3$) P.M. 119,38 (Dinâmica[®])
15. Dithiothreitol – DTT (Invitrogen Life Technologies[™])
16. DNA Ladder (123 bp) (Invitrogen Life Technologies[™])
17. dNTP Set (100 mM), 4 x 250 μ L; 25 μ mol each (100 mM dATP Solution, 100 mM dCTP Solution, 100 mM dGTP Solution, 100 mM dTTP Solution) (Invitrogen Life Technologies[™])
18. Dodecil sulfato de sódio – Lauril Sulfato de Sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) P.M. 288,38 (Synth[®])
19. Ethidium bromide ($C_{21}H_{20}N_3Br$) P.M. 394,3 (Sigma[®])
20. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
21. Fosfato de sódio monobásico ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
22. Glicose
23. Guanidine isothiocyanate P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
24. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
25. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
26. Metanol, P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
27. M-MLV Reverse Transcriptase - 200 units/ μ L (Invitrogen Life Technologies[®])
28. PCR-buffer (10X) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies[™])
29. *Platinum* Taq DNA Polymerase recombinant 500 units (Invitrogen Life Technologies[™])

30. RT-Buffer (5X) (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 15 mM MgCl₂, 375 mM KCl) (Invitrogen Life Technologies™)
31. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (Reagen®)
32. Silicon dioxide (SiO₂) P.M. 60,08 (Sigma®)

APÊNDICE B
Soluções e Tampões

- **Hidratação da sílica**

- 60 g de sílica (SIGMA[®])
- Adicionar 500 mL de água MilliQ autoclavada
- Agitar lentamente e manter em repouso durante 24 h
- Por sucção, desprezar 430 mL do sobrenadante
- Ressuspender a sílica em 500 mL de água bidestilada
- Manter em repouso durante 5 h para sedimentar
- Desprezar 440 mL do sobrenadante
- Adicionar 600 µL de HCl (32% w/v) para ajustar o pH (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**

- Azul de bromofenol 0,25%
- Sacarose – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) 45%

- **Fenol / clorofórmio – álcool isoamílico (25:24:1)**

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

APÊNDICE C
Protocolo de Técnicas

- **Suspensão fecal – Extração bruta**
 - 1g do extrato fecal
 - 9 ml de tampão TRIS/Ca²⁺ 1X
(Para amostras muito líquidas estabelecer proporção 1:2)
 - Homogeneizar
 - Centrifugar 10 min a 10.000 x g
 - Recolher sobrenadante
 - Identificar e estocar em frascos a 4° C

- **Extração do RNA**
 - Aliquotar 400 µL da suspensão fecal
 - Adicionar 40 µL de **SDS** 10%
 - Homogeneizar em vórtex
 - Banho-maria à 56°C durante 20 min
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s
 - Adicionar 400 µL de **fenol / clorofórmio – álcool isoamílico**
 - Homogeneizar em vórtex
 - Banho-maria à 56°C durante 15 min
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 10 min
 - Recolher sobrenadante em outro tubo
 - Adicionar 500 µL de solução **L6**
 - Adicionar 30 µL de **sílica** hidratada
 - Homogeneizar em vórtex
 - Agitar durante 30 min em temperatura ambiente
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Adicionar 500 µL de solução **L2**
 - Homogeneizar em vórtex
 - Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s
 - Desprezar sobrenadante em solução contendo NaOH 10M
 - Repetir 1x os quatro últimos passos
 - Adicionar 1 mL de **etanol** a 70%

- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 30 s
- Desprezar sobrenadante
- Repetir 1x os quatro últimos passos
- Adicionar 1 mL de **acetona** PA
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 1 min
- Desprezar sobrenadante
- Secar o *pellet* em termo bloco a 60° C durante 2 min
- Adicionar 50 µL de água DEPC
- Homogeneizar em vórtex
- Banho-maria à 56° C durante 15 min
- Homogeneizar em vórtex
- Centrifugar a 10.000 x g durante 2 min
- Recolher sobrenadante em eppendorf de 500 µL
- Estocar a -20°C

- **Primers**

P289 (reverse): **5'** TGACAATGTAATCATCACCATA **3'**

P290 (forward): **5'** GATTACTCCAAGTGGGACTCCAC **3'**

Fragmentos: NoV 319 pb

SaV 331 pb

- **RT-MIX (para uma reação)**

Buffer 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 8.3); KCl 375 mM; MgCl₂ 15 mM]: 4,0 µL

DTT (0,1 M): 2,0 µL

dNTP (0,1 mM): 1,0 µL

M-MLV (200 U/µL): 0,5 µL

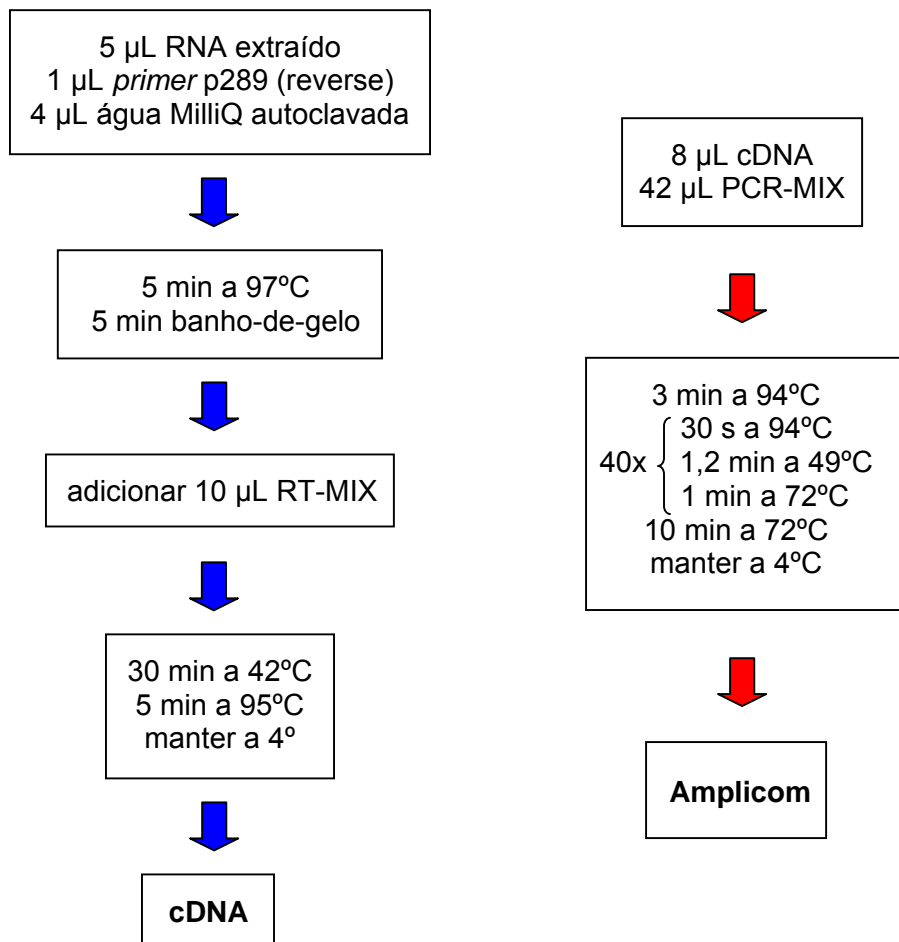
Água: 2,5 µL

- **PCR-MIX (para uma reação)**

Buffer 10x [Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM]: 7,5 µL

MgCl₂ (50 mM): 2,0 µL
dNTP (0,1 mM): 4,0 µL
p289 (20 pmol): 1,0 µL
p290 (20 pmol): 1,0 µL
Platinum[®] Taq DNA Polymerase (5 U/µL): 0,5 µL
Água: 26,0 µL

- **RT-PCR**



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

- 1 g de agarose

- 50 mL TEB buffer (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM) pH 8.4

- 30 μ L de brometo de etídeo (0.5 μ g/ml)

Amostra: 8,0 μ L do amplicom e 2,0 μ L tampão de amostra

Corrida por aproximadamente 45 minutos a 100V e 80A

Visualização em transiluminador de luz ultravioleta