



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DAIANE GÜLLICH DONIN

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO *TESCHOVIRUS A*,
SAPELOVIRUS A E *ENTEROVIRUS G* EM SUÍNOS
DOMÉSTICOS E SELVAGENS NO BRASIL**

Londrina
2015

DAIANE GÜLLICH DONIN

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO *TESCHOVIRUS A*,
SAPELOVIRUS A E *ENTEROVIRUS G* EM SUÍNOS
DOMÉSTICOS E SELVAGENS NO BRASIL**

Tese 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 Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Amauri Alcindo Alfieri.

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D683e Donin, Daiane Güllich.

Epidemiologia molecular do *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G*
em suínos domésticos e selvagens no Brasil / Daiane Güllich Donin. –
Londrina, 2015.
87 f. : il.

Orientador: Amauri Alcindo Alfieri.

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

1. Suíno – Doenças – Brasil – Teses. 2. Diarreia em suíno– Teses. 3. Suíno –
Infecções – Teses. 4. Virologia molecular – Teses. 5. Reação em cadeia de polimerase
– Teses. I. Alfieri, Amauri Alcindo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro
de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.


CDU 619:636.2

DAIANE GÜLLICH DONIN

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO *TESCHOVIRUS A*,
SAPELOVIRUS A E *ENTEROVIRUS G* EM SUÍNOS DOMÉSTICOS E
SELVAGENS NO BRASIL**

Tese 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 Doutor.

BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a. Alice Alfieri
Universidade Estadual de Londrina



Prof.^a. Dr.^a. Elis Lorenzetti
Universidade Estadual de Londrina



Prof. Dr. Selwyn Arlington Headley
~~Universidade Estadual de Londrina~~



Prof. Dr. Everson Zotti
Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Prof. Dr. Luiz César da Silva
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 09 de outubro de 2015.

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

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

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

DEDICA

À minha mãe Lenir Güllich Donin (*in memoriam*), a qual levo diariamente comigo em meu coração, e que certamente estaria vibrando comigo por esta importante etapa vivida.

AGRADECIMENTOS

A *Deus* por me permitir estar e chegar até aqui, por estar sempre ao meu lado, preenchendo meu ser com alegria e entusiasmo.

Ao meu orientador professor Dr. *Amauri Alcindo Alfieri*, por seu exemplo de dedicação e profissionalismo. Durante sua orientação transmitiu vastos bons ensinamentos e apontou direcionamentos importantes para realização desta pesquisa. Muito obrigada!

À colega *Raquel de Arruda Leme* pelos ensinamentos transmitidos integralmente durante minha passagem pelo Laboratório de Virologia. Obrigada pela paciência, prontidão em ajudar e dedicação ao trabalho. Certamente você fez a diferença no desenvolvimento deste projeto, e não mediu esforços nem tempo para me auxiliar a realizar as análises e publicar os resultados das mesmas.

Ao meu mestre, amigo e companheiro *Geraldo Camilo Alberton* que me impulsionou na busca de especialização, pelo seu exemplo e apoio, mas acima de tudo, por sua alegria. Obrigada por sua compreensão nos momentos difíceis e por vibrar comigo nos bons momentos. Você é o verdadeiro professor, que muda a vida das pessoas quando ilumina com seus conhecimentos suas mentes. Você mudou minha vida. Seus conselhos e suas palavras mudaram minha maneira de ver o mundo.

À minha filha *Júlia Donin Spessatto* pela força nos momentos de despedida, pela alegria de viver e pleno entendimento do objetivo e dos motivos de minhas ausências durante estes anos de estudo. Você é uma pessoa iluminada e muito especial, que me motiva a seguir em frente todos os dias com mais determinação. Obrigada por sua espera e alegria a cada retorno meu para o lar.

Ao meu pai *Danilo Antônio Donin* e a eterna mestre *Simone Benghi Pinto* pela torcida, preocupação e incentivo antes e durante o período de viagens e ausência.

Às minhas irmãs, *Danilene Güllich Donin Berticelli* e *Patrícia Güllich Donin* pelo apoio e pelas palavras de incentivo durante a etapa de conclusão deste trabalho. Muito obrigada por me fazer sentir mais confiante e tranquila.

À minha avó *Lorena Bertha Güllich* que, com sua limitação de estudos, porém com abundância de conhecimentos sempre me incentivou a continuar estudando e buscar aprender mais e mais. Mesmo um tanto esquecida, pelo avançar da idade, sempre me estimulou a fazer o doutorado.

Aos membros da comissão examinadora da banca de qualificação professores: **Selwyn Arlington Headley**, **Elis Lorenzetti** e **Alice Fernandes Alfieri** por disponibilizarem seu tempo para realizar a correção deste trabalho e sugerir valiosas contribuições que certamente enriqueceram o mesmo.

À **Camila Dias Spessatto** pela atenção, carinho e dedicação à minha filha durante as minhas várias viagens de estudo, ajudando-a nos seus momentos de estudo, ensinando-a e cobrando dela bons resultados.

Ao **Julio Cesar Spessatto** pela prontidão em atender às necessidades da Júlia durante minha ausência e por ter manifestado total apoio à concretização deste projeto desde o momento inicial de sua concepção.

Ao cunhado **João Marcos Alberton** pelo apoio e ensinamentos à Júlia durante os momentos em que esteve com ela, despertando nela o interesse pelas artes e fazendo florescer um dom lindo que nela existe.

A todos os demais familiares que torceram por mim, meu muito obrigada!

A todos os mestres do programa de Pós-graduação em Ciência Animal, em especial os mestres **Italmar Navarro** e **Marcelo Seneda** e ao mestre **Fabiano Montiani** do programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná, que com seus curtos momentos de convivência durante as disciplinas, conseguiram transmitir diversos conhecimentos, mas acima de tudo, fazer com que desenvolvesse o senso crítico com relação às diversas situações da vida. Vocês mostraram mais uma vez que o excelente professor não é aquele que apenas reproduz um conteúdo, mas sim faz com que seus alunos pensem, não apenas acerca dele, mas de tudo que está ao seu redor, contribuindo dessa forma para a formação da consciência crítica.

Aos residentes, funcionários, estagiários, pós-graduandos e toda equipe de trabalho do Laboratório de Virologia da Universidade Estadual de Londrina pelos ensinamentos, colaboração e paciência para a realização das análises laboratoriais.

À **Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina**, que, mediante consenso do colegiado de Medicina Veterinária permitiu que eu me afastasse e realizasse esta especialização, logo que concluído meu estágio probatório, em especial, ao coordenador **André Luis Filadelpho** e à colega **Jovanir Inês Müller Fernandes** pelo grande incentivo.

À **Universidade Estadual de Londrina** por abrir as portas do conhecimento para diversos alunos, em especial, pós-graduandos, colaborando para que os profissionais possam aprofundar seus conhecimentos, obter diferentes pontos de vista mediante a escuta das aulas e

conversas com seus exemplares docentes, atuando dessa forma como ferramenta para melhorar a educação neste país e a qualidade de vida das pessoas e dos animais.

Às agências e órgãos de fomento de pesquisa Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**), Financiadora de Estudos e Projetos (**FINEP**) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná (**FAP/PR**) pelo suporte financeiro para desenvolvimento desta pesquisa.

À **Helenice Kieski**, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina que sempre me atendeu com prontidão e alegria nos diversos momentos de dúvidas e respondeu com muita precisão todas as solicitações. Encontrar pessoas como você pelo caminho tornam o percorrer do mesmo muito mais agradável.

Aos amigos e amigas que me apoiaram e deram força neste momento, em especial às amigas **Thais Stein Krames**, **Adriana Buttini** e **Simone Pupo** pelo incentivo, pela parceria e pelos bons momentos de conversa. Saber que têm pessoas com as quais podemos contar a qualquer momento faz a vida mais feliz, em especial quando são pessoas como vocês. À amiga **Thais** ainda agradeço a paciência em me ouvir nos momentos de cansaço e a força para continuar sempre.

Às lindas pessoas que estiveram comigo durante a etapa de qualificação desta tese, torcendo e rezando para que tudo desse certo, me incentivando e mandando energia positiva, **Camila Garghetti**, **Elisandro Pires Frigo** e **Kesya**, **Simone Pupo**, dupla dinâmica **Isabela** e **Isadora Berticelli**, **Nena** e **Cris Krames**, **Tia Odete Koche**, **Tatyane** e **Almir Cunico**, minhas irmãs **Dani** e **Pati Donin**, **Gera Alberton** e **Julica**, às amigas **Jô Inês Müller Fernandes** e **Laura Helena França de Barros**, à aluna **Glaci Kasper**, e em especial à família de **Dona Ira Berticelli**. **Vânia Berticelli Basso**, **Selmar Basso**, **D. Ira**, **Seu Décio**, **Vilson**... todos vocês fizeram me sentir mais segura. Tenham certeza que minha gratidão a todos é enorme. Muito obrigada!!!

Aos alunos, e hoje colegas, do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná **Gefferson Almeida** e **Angélica Schmeing** pelo grande auxílio durante as coletas do material e pelo grande interesse e apoio ao projeto. Igualmente agradeço todos os alunos pertencentes ao grupo de estudos **Prossui** pela prontidão em atender a qualquer solicitação durante o período de execução deste projeto e por conduzirem as atividades do grupo com grande dedicação. Ao colega **Gefferson Almeida** também agradeço a colaboração na

condução de todas as atividades e projetos durante os momentos de afastamento ou de isolamento para concretização deste trabalho.

Aos colegas *Antônio Franciscus Kramer Nogueira* e *Ricardo Josué Cogo*, que exerceram papel fundamental na condução dos trabalhos na Universidade Federal do Paraná durante meu período de afastamento para execução da pesquisa.

A todos os médicos veterinários que abriram as portas de suas propriedades ou locais de trabalho para permitir a coleta de material para as análises laboratoriais. Em especial ao Médico Veterinário *Valdecir Mauerwerck* que colaborou imensamente para a coleta de material para pesquisa.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a execução deste trabalho, agradeço imensamente!

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

DONIN, Daiane Güllich. **Epidemiologia molecular do *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G* em suínos domésticos e selvagens no Brasil**. 2015. 87 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Os picornavírus entéricos suínos (PEVs), *Teschovirus A* (TV-A), *Sapelovirus A* (SV-A) e *Enterovirus G* (EV-G) são agentes infecciosos específicos dos suínos que se encontram disseminados pelos rebanhos suinícolas em todo o mundo. Na maioria dos casos se apresentam de forma assintomática, porém têm sido associados a uma variedade de enfermidades, dentre elas doenças entéricas, reprodutivas, respiratórias e neurológicas. Este estudo visou avaliar a infecção natural pelos PEVs em rebanhos de três importantes regiões geográficas produtoras de suínos do Brasil. Para isso, foram realizados dois estudos, utilizando a reação em cadeia da polimerase precedida por transcrição reversa (RT-PCR) e *nested*-PCR que tiveram como alvo a região conservada 5' não traduzida (5'NTR) do genoma destes vírus. O primeiro estudo teve como objetivo avaliar a frequência de infecção natural por TV-A, SV-A e EV-G em criações de suínos localizadas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país. Foram selecionadas aleatoriamente 40 amostras de fezes com consistência normal ($n=17$) e diarreica ($n=23$) de leitões lactentes ($n=22$) e desmamados ($n=18$). Foi possível demonstrar que tanto a infecção pelo TV-A quanto pelo EV-G foi comum entre os leitões lactentes (1 a 3 semanas de idade), com frequência de 40,9% (9/22) em infecções singulares e mistas. O SV-A não foi detectado nesta categoria animal. Nos leitões desmamados (4 a 8 semanas de idade) foi observada maior frequência destes agentes (77,8%, 14/18) nas amostras fecais, sendo mais comum a observação de infecções mistas pelo TV-A e EV-G (4/14). Somente foram detectadas infecções singulares por TV-A e EV-G. O SV-A foi identificado em infecção mista com os outros agentes em 38,8% (7/18) das amostras avaliadas. Para confirmar a especificidade dos fragmentos amplificados neste estudo, duas amostras positivas para cada vírus na *nested*-PCR foram selecionadas para sequenciamento. As cepas de TV-A, SV-A e EV-G detectadas no Brasil revelaram alta identidade nas sequências de nucleotídeos com as disponíveis em bases públicas de dados. Este estudo concluiu que as regiões geográficas brasileiras pesquisadas apresentam ao menos dois dos vírus estudados circulando entre leitões lactentes e desmamados. O segundo estudo teve como objetivo avaliar a distribuição da infecção pelos PEVs entre javalis do estado do Paraná e avaliar catetos e queixadas como portadores para estes três vírus. Foram analisadas 36 amostras de fezes de animais assintomáticos. Vinte e dois javalis com idade entre 2 e 7 meses ($n=14$) e entre 2 e 4 anos ($n=8$) e 14 catetos e queixadas com idade de 6 a 8 meses foram avaliados. Os PEVs foram detectados em 54,5% (12/22) das amostras de javalis. O vírus mais frequente foi EV-G (50%, 11/22), seguido por TV-A (45,5%, 10/22) e SV-A (18,2%, 4/22). De acordo com a idade, animais jovens foram mais frequentemente infectados que os adultos. Um produto amplificado na *nested*-PCR de cada um dos vírus foi submetido ao sequenciamento. A sequência de nucleotídeos das cepas deste estudo mostrou alta identidade com as sequências de PEVs disponíveis em bases públicas de dados, incluindo as relatadas no Brasil no primeiro estudo. Catetos e queixadas foram negativos para os três vírus. Neste estudo, foi possível comprovar pela primeira vez a circulação de TV-A, SV-A e EV-G em javalis do Brasil e demonstrar que catetos e queixadas não foram positivos para estes patógenos exclusivos dos suínos. Desta forma, foi possível demonstrar que a infecção por TV-A, SV-A e EV-G está presente nas diferentes regiões geográficas produtoras de suínos do Brasil, tanto em fezes com consistência normal quanto em diarreicas, e também em javalis no Brasil.

Palavras-chave: *Picornaviridae*. *Nested* RT-PCR. Javalis. Fezes. Diarreia. Infecção natural.

DONIN, Daiane Güllich. **Molecular epidemiology of *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* and *Enterovirus G* in domestic pigs and wild boars in Brazil.** 2015. 87 p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Porcine enteric picornaviruses (PEVs), *Teschovirus A* (TV-A), *Sapelovirus A* (SV-A) and *Enterovirus G* (EV-G) are specific infectious agents of swine spread worldwide. In most cases are asymptomatic, but also associated with a variety of diseases such as enteric, reproductive, respiratory, and neurological disorders. This study aimed to investigate the natural infection with PEVs in herds of three important pig-producing geographical regions of Brazil. Two studies were performed by using the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay and *nested*-PCR targeting the conserved 5' nontranslated region (5'NTR) of the genome of the viruses. The first study aimed to evaluate the frequency of natural infection by TV-A, SV-A, and EV-G in pig farms located in Southern, Southeast and Midwest regions of the country. Forty diarrheic ($n=23$) and normal ($n=17$) consistency fecal samples from suckling ($n=22$) and nursery ($n=18$) pigs were randomly selected. The results revealed that TV-A and EV-G infections were common between suckling pigs (1 to 3 weeks old), with frequency of 40.9% (9/22) in single or mixed infections. SV-A was not detected in this age group. For nursery pigs (4 to 8 weeks old), higher detection rate (77.8%, 14/18) of these agents were observed in fecal samples, with mixed infections with TV-A and EV-G more commonly observed (4/14). Only single infection with TV-A and EV-G were observed in these animals. SV-A was detected only in mixed infection with the other agents in 38.8% (7/18) of the samples analyzed. To confirm the specificity of the amplified products in this study, two *nested*-PCR positive samples from each virus were selected for sequencing analyses. Strains of TV-A, SV-A and EV-G detected in Brazil showed high nucleotides sequences identity with others available in public database. This study concluded that the Brazilian regions evaluated showed at least two of the tested viruses in suckling and nursery pigs. The second study aimed to investigate the PEVs infection distribution in wild boars of Paraná state and to evaluate peccaries as carrier's species for these three viruses. Fecal samples from 36 asymptomatic wild boars were analyzed. Twenty-two wild boars with ages ranging from two to seven months old ($n=14$) and two to four years old ($n=8$) and 14 peccaries aged 6 to 8 months old were evaluated. PEVs were detected in 54.5% (12/22) wild boar samples. EV-G was the most frequently virus detected (50%, 11/22), followed by TV-A (45.5%, 10/22) and SV-A (18.2%, 4/22). Regarding the age groups, young wild boars were more frequently infected than adult animals. One *nested*-PCR amplified product for each of the viruses was submitted to sequencing analysis. The nucleotide sequences showed high identity with the PEVs sequences described available in public database, including those reported in the first study in Brazil. Peccaries were negative for the three viruses. In this study, it was possible to demonstrate for the first time TV-A, SV-A and EV-G circulating in wild boars in Brazil and demonstrate that peccaries were not positive to these pathogens that are exclusive of swine. In conclusion, it was possible to demonstrate that infection with TV-A, SV-A and EV-G is present in the different pig-producing geographical regions of Brazil, in normal and diarrheic consistency fecal samples and also in wild boars in Brazil.

Keywords: *Picornaviridae*. *nested* RT-PCR. Wild boars. Faeces. Diarrhea. Natural infection.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequência de ocorrência de TV-A, SV-A e EV-G em suínos domésticos (SD) e javalis (J)	34
Tabela 2 -	Técnicas de diagnóstico molecular de PEVs empregadas em suínos domésticos em diferentes amostras.	37

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Árvore filogenética da família Picornaviridae, baseada na região P1 do genoma das espécies virais.....	16
Figura 2 -	Principais características dos vírus pertencentes à família Picornaviridae	17
Figura 3 -	Ilustração esquemática da patogênese dos PEVs.....	20
Figura 4 -	Leitões na fase de creche positivos para TV-A apresentando prostração em função da paralisia dos membros posteriores	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CSFV -	<i>Classical swine fever virus</i> (Vírus da peste suína clássica)
CPE -	<i>Cytopathic effect</i> (Efeito citopático)
EV-G -	<i>Enterovirus G</i>
ICTV -	<i>International Committee on Virus Taxonomy</i> (Comitê Internacional de Taxonomia Viral)
kb -	Quilobases
NTR -	<i>Nontranslated Region</i> (Região não traduzida)
OIE -	<i>World Organization for Animal Health</i> (Organização Internacional de Saúde Animal)
ORF -	<i>Open reading frame</i> (Fase aberta de leitura)
PCR -	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PCV2 -	<i>Porcine circovirus type 2</i> (Circovírus suíno 2)
PED -	<i>Porcine epidemic diarrhea</i> (Diarreia epidêmica dos suínos)
PEDV -	<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i> (Vírus da diarreia epidêmica dos suínos)
PEVs -	<i>Porcine enteric picornaviruses</i> (Picornavírus entéricos suínos)
PPV -	<i>Porcine parvovirus</i> (Parvovírus suíno)
PSV -	<i>Porcine Sapelovirus</i> (Sapelovírus suíno)
PTV -	<i>Porcine Teschovirus</i> (Teschovírus suíno)
PWMS -	<i>Post-weaning multisystemic wasting syndrome</i>

(Síndrome multissistêmica de definhamento dos suínos no período pós-desmame)

- PRRSV - *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus*
(Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos)
- qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa
- RT-PCR - Transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase
- SMEDI - *Stillbirth, Mummified fetuses, Embryonic Death and Infertility Syndrome*
(Síndrome natimorto, feto mumificado, mortalidade embrionária e infertilidade)
- SNC - Sistema nervoso central
- RNAfs - *Single-stranded RNA*
(RNA de fita simples)
- SV-A - *Sapelovirus A*
- TGEV - *Transmissible gastroenteritis virus*
(Vírus da gastroenterite transmissível)
- TV-A - *Teschovirus A*
- VP - Proteína viral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	15
2.1	CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E MOLECULARES DOS PICORNAVIRUS ENTÉRICOS SUÍNOS	15
2.2	EPIDEMIOLOGIA E POTENCIAL PATOGÊNICO DOS PICORNAVÍRUS ENTÉRICOS SUÍNOS	18
2.2.1	<i>TESCHOVIRUS A</i>	22
2.2.2	<i>SAPELOVIRUS A</i>	29
2.2.3	<i>ENTEROVIRUS G</i>	31
2.3	INFECÇÕES MISTAS PELOS PICORNAVÍRUS ENTÉRICOS SUÍNOS	34
2.4	DIAGNÓSTICO DE TV-A, SV-A E EV-G	35
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	40
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVO GERAL	48
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	50
ARTIGO A –	FIRST REPORT OF PORCINE TESCHOVIRUS (PTV), PORCINE SAPELOVIRUS (PSV) AND ENTEROVIRUS G (EV-G) IN PIG HERDS OF BRAZIL	50
ARTIGO B –	MOLECULAR SURVEY OF PORCINE TESCHOVIRUS, PORCINE SAPELOVIRUS AND ENTEROVIRUS G IN CAPTIVE WILD BOARS (<i>SUS SCROFA SCROFA</i>) OF PARANÁ STATE, BRAZIL.	57

5	CONCLUSÕES.....	65
	APÊNDICES	66
	APÊNDICE A - Sequências Genômicas.....	67
	ANEXOS	69
	ANEXO A - LISTA DE REAGENTES	70
	ANEXO B - SOLUÇÕES E TAMPÕES	73
	ANEXO C - PROTOCOLO DE TÉCNICAS	81
	ANEXO D - LISTA DE SOFTWARES	87

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A relevância da suinocultura no contexto mundial justifica a crescente demanda de conhecimentos relativos à produtividade dos animais, à sanidade e à segurança alimentar. A atividade é responsável pelo desenvolvimento econômico e social de muitos estados e países e, acima de tudo, é importante produtora de alimentos para a população em um cenário onde se apresenta perspectiva de crescimento contínuo ao longo das próximas décadas (NAPOLITANO, 2012). O Brasil, quarto maior produtor e exportador mundial de carne suína (ABPA, 2015), desempenha papel importante como fornecedor de animais saudáveis e produtos de origem animal de qualidade e enfrenta desafios como fortalecer o mercado interno, aumentar os volumes exportados, diversificar os mercados e eliminar barreiras sanitárias.

Superar desafios requer conhecimento dos agentes infecciosos presentes nos rebanhos suinícolas e prevenção de surtos mediante o monitoramento de diversos fatores que facilitam a entrada, o estabelecimento e a disseminação dos agentes patogênicos. Neste contexto, à medida que controlamos e implementamos medidas profiláticas, outros agentes encontram condições de emergir ou reemergir, devido à interação contínua e complexa entre agente – suíno – ambiente (REIS, 2005).

As principais doenças que acometem os suínos nas fases de maternidade, creche, crescimento e terminação são as doenças entéricas e respiratórias, que têm grande impacto sobre o desempenho dos animais e custos de produção (VANNUCCI e GUEDES, 2009; BRITO et al., 2014). Já para as matrizes em reprodução, somam-se a estas enfermidades as doenças reprodutivas, que colaboram para redução da produtividade (KWIT et al., 2015). Os agentes infecciosos têm grande participação tanto nos problemas entéricos e respiratórios, quanto nos problemas reprodutivos. Dentre eles, os vírus assumem papel de importância, sendo frequente a observação de surtos de origem viral e a infecção por agentes virais capazes de infectar os humanos (MA et al., 2015).

Conhecer os agentes virais que circulam nos rebanhos suinícolas brasileiros e as manifestações clínicas desencadeadas por sua presença é fundamental. Dada a capacidade de escape à resposta imune do hospedeiro, graças a fenômenos como mutação e/ou recombinação genética, estes agentes podem infectar indivíduos não imunes ou novas espécies hospedeiras, desencadeando surtos ocasionais (SHAN et al., 2011). Desta maneira, o monitoramento dos agentes virais que circulam em rebanhos brasileiros e mundiais é

necessário para o estabelecimento do perfil das infecções virais emergentes, o que permite o planejamento estratégico de medidas de controle e prevenção de doenças.

Algumas espécies virais da família *Picornaviridae* que acometem especificamente suínos, denominados picornavírus entéricos suínos (PEVs), foram identificados em diversos países do mundo (OIE, 2008; LAN et al., 2011) e podem estar envolvidos em desordens entéricas, respiratórias, reprodutivas e neurológicas (CANO-GÓMEZ et al., 2013; YAMADA et al., 2014). Adicionalmente, quadros de pericardite, miocardite e lesões atípicas na pele também foram associados a estes agentes virais (ALEXANDERSEN et al., 2012; CHIU et al., 2012; YAMADA et al., 2014). A relevância dos PEVs para a suinocultura foi demonstrada em diversos países mediante a ocorrência de casos clínicos isolados ou na forma de surtos (YAMADA et al., 2004; SALLES et al., 2011; CHEN et al., 2012; CHIU et al., 2012; HANDKE et al., 2012; LIN et al., 2012; SCHOCK et al., 2014).

No Brasil, são escassos os estudos relativos aos PEVs em rebanhos suinícolas. O sistema intensivo de criação de suínos no país e a sua tecnificação permitem grande densidade animal, o que faz com que seja comum a infecção simultânea dos animais por dois ou mais patógenos (YUE et al., 2009; XU et al., 2012), além de aumentar o risco de transmissão de agentes infecciosos entre os animais (SHAN et al., 2011). Desta forma, o conhecimento sobre a circulação de PEVs, bem como o seu monitoramento, em rebanhos suínos brasileiros é de grande relevância.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS E MOLECULARES DOS PICORNAVÍRUS ENTÉRICOS SUÍNOS

Os PEVs pertencem à família *Picornaviridae*, uma das seis famílias da ordem *Picornavirales*. Inicialmente, os PEVs eram classificados em um único gênero, denominado *Enterovirus* (HYYPIÄ et al., 1997), constituído pelos sorotipos 1 a 13. Com base na vírus neutralização e utilizando a característica biológica do efeito citopático (*cytopathic effect* – CPE) viral em cultivo celular, os PEVs foram divididos em três grupos: grupo I, compreendendo os sorotipos 1-7 e 11-13; grupo II, o sorotipo 8; e grupo III, agrupando os sorotipos 9 e 10 (KAKU et al., 1999).

Análises moleculares das sequências genômicas dos enterovírus suínos possibilitaram reclassificá-los como espécies pertencentes a três gêneros virais distintos, denominados *Teschovirus*, *Sapelovirus* e *Enterovirus* (KRUMBHOLZ et al., 2002; ICTV, 2015). Assim, os PEVs pertencentes ao grupo I foram reclassificados no gênero *Teschovirus*, espécie *Teschovirus A* (TV-A). Aqueles pertencentes ao grupo II foram classificados como *Enterovirus suíno A*, e posteriormente renomeados como *Sapelovirus A* (SV-A) dentro do gênero *Sapelovirus*. Os *Enterovirus 9* e *10*, ou grupo III, foram classificados como a espécie *Enterovirus suíno B* e, posteriormente, renomeados como *Enterovirus G* (EV-G) no gênero *Enterovirus* (ZELL et al., 2001; KRUMBHOLZ et al., 2002; ICTV, 2015).

Atualmente a família *Picornaviridae* contempla 29 gêneros (ICTV, 2015), oito dos quais contêm espécies que infectam os suínos: *Aphthovirus* (*Foot-and-mouth disease virus*), *Enterovirus* (*Swine vesicular disease virus* e *Enterovirus G*), *Cardiovirus* (*Encephalomyocarditis virus*), *Teschovirus* (*Teschovirus A*), *Sapelovirus* (*Sapelovirus A*), *Senecavirus* (*Senecavirus A*), *Kobuvirus* (*Aichivirus C*) e *Pasivirus* (*Pasivirus A*) (ALEXANDERSEN et al., 2012) (Figura 1).

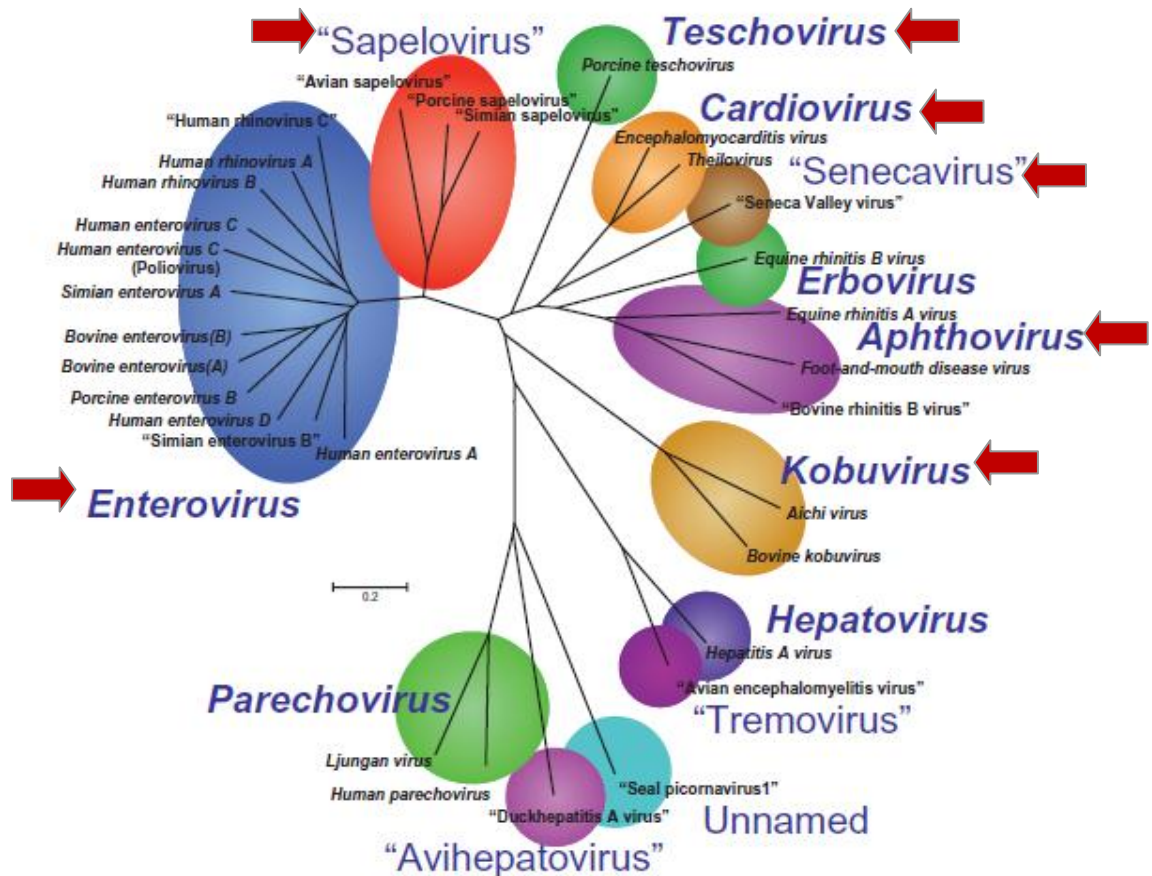


Figura 1. Árvore filogenética da família *Picornaviridae*, baseada na comparação da região P1 do genoma das espécies virais. Representação de 13 dos 29 gêneros que fazem parte desta família atualmente. Os gêneros de importância para os suínos estão destacados com setas, não constando na representação o gênero *Pasivirus* (SAUVAGE et al., 2012).
Fonte: MACLACHLAN and DUBOVI (2011).

Os picornavírus são pequenos, icosaédricos, não envelopados e com genoma de 6.2 – 8.5 kilobases (kb) de nucleotídeos (LEWIS-ROGERS e CRANDALL, 2010). Os vírus dessa família possuem de 25 a 30 nm de diâmetro e genoma constituído por RNA fita simples (RNAs) de polaridade positiva (NASRI et al., 2007) (Figura 2).

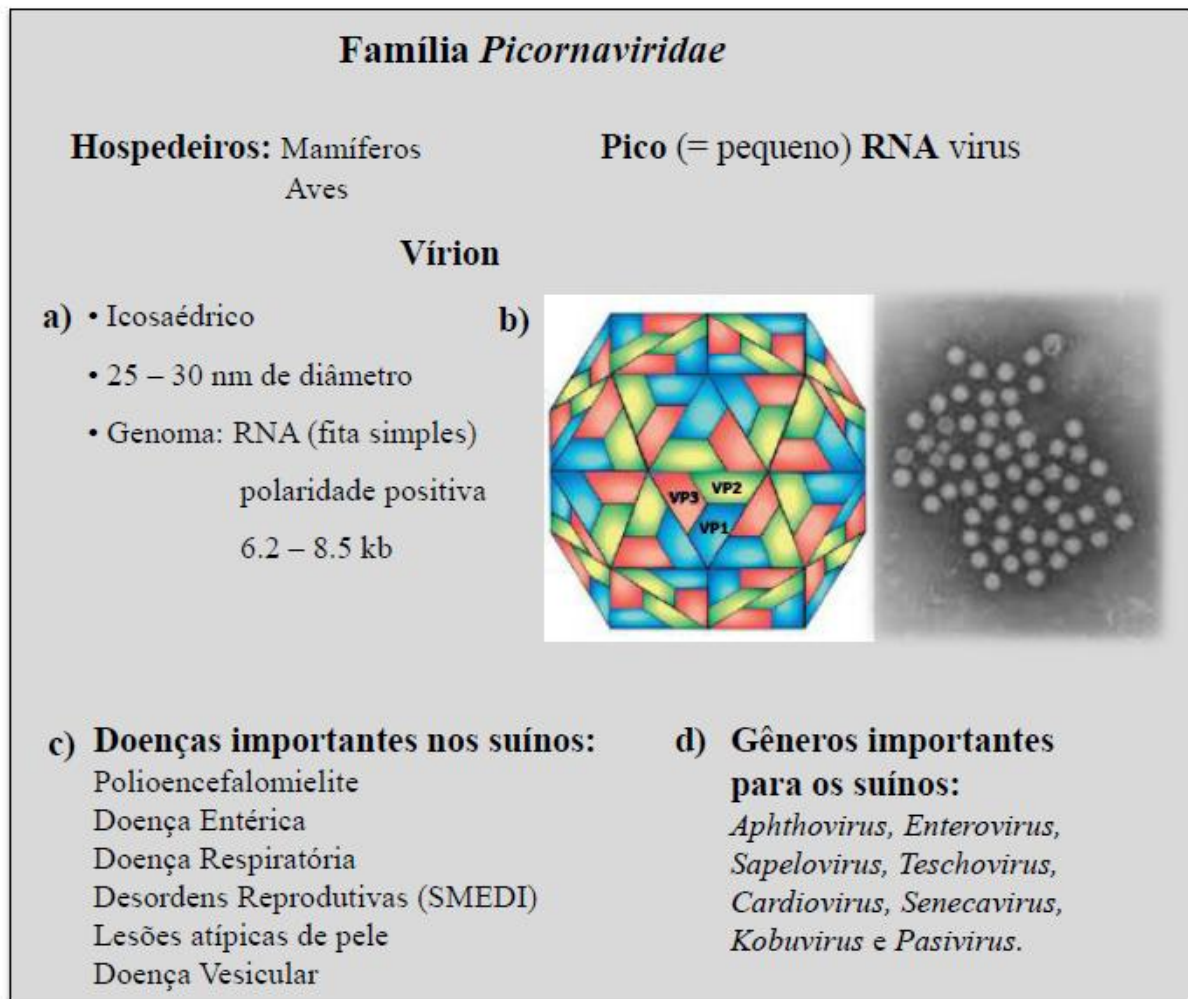


Figura 2. (A) Principais características dos vírus pertencentes à família *Picornaviridae*. (B) Representação esquemática e microscópica de uma partícula viral com formato icosaédrico com as três proteínas estruturais encontradas na superfície, VP1, VP2 e VP3. (C) Manifestações clínicas mais relevantes e (D) gêneros de importância para os suínos.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Estes vírus compartilham organização comum do genoma, que se encontra dividido em três regiões: região 5' não traduzida (*Nontranslated Region – 5' NTR*), a sequência aberta de leitura (*Open Reading Frame – ORF*) da poliproteína, e a região 3' NTR, que possui cauda Poli(A) (LEWIS-ROGERS e CRANDALL, 2010).

A região 5' NTR codifica proteínas que atuam no processo de replicação viral. A poliproteína divide-se em três regiões maiores, denominadas P1, P2 e P3. A região P1 codifica as proteínas estruturais do capsídeo, denominadas VP1, VP2, VP3 e VP4, enquanto as regiões P2 e P3 codificam proteínas envolvidas no processamento das demais proteínas e

na replicação viral. A região 3' NTR dos picornavírus é relativamente curta e possui estruturas que controlam a síntese de RNA viral (RACANIELLO, 2007).

O capsídeo dos picornavírus é formado por 60 unidades proteicas idênticas, cada uma contendo cópia de uma das quatro VPs, arranjadas em formato icosaédrico (LIU et al., 2014), sendo variável o comprimento e a função das proteínas codificadas pelos diferentes gêneros. As VP1, VP2 e VP3 não têm homologia nas sequências; no entanto, as três proteínas têm a mesma topologia, estando localizadas na superfície do vírion. A VP4 difere significativamente das outras três proteínas estruturais e fica localizada na porção interna do capsídeo. Essa proteína delimita a estrutura interna do capsídeo e confere rigidez à estrutura do vírion (UPADHYAYA et al., 2014).

Os vírus da família *Picornaviridae* têm ancestral comum e, sob este aspecto, a análise filogenética das sequências genômicas é a ferramenta mais útil para a sua classificação, uma vez que permite verificar o grau de identidade entre os vírus pertencentes a este grupo (LA ROSA et al., 2006).

Altas taxas de mutação, 10^{-3} a 10^{-5} por nucleotídeo, podem ocorrer nos picornavírus por ocasião da replicação, o que permite a origem de distintas variantes genéticas dos vírus desta família (DOMINGO e HOLLAND, 1994; VAN DUNG et al., 2014).

2.2 POTENCIAL PATOGENICO DOS PICORNAVÍRUS ENTÉRICOS SUÍNOS

Os enterovírus suínos foram inicialmente relacionados como agentes etiológicos de uma síndrome reprodutiva nesta espécie. A síndrome, conhecida pela sigla SMEDI, se manifesta em matrizes gestantes, e determina o nascimento de leitões natimortos (*Stillbirth*), a ocorrência de mumificação fetal (*Mummified fetuses*), morte embrionária (*Embryonic Death*) e/ou infertilidade (*Infertility*) (ALEXANDERSEN et al., 2012; CHIU et al., 2012; ROEHE e BRITO, 2012). Além de desordens reprodutivas, os PEVs também foram associados a desordens neurológicas, entéricas, respiratórias e a lesões de pele nos suínos (KRUMBHOLZ et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que infecções assintomáticas e/ou subclínicas por diferentes sorotipos de PEVs tornaram-se endêmicas nos rebanhos suínos de diversos países do mundo como EUA, China, República Tcheca e Brasil (BANGARI et al., 2010; CHIU et al., 2012; PRODELALOVA, 2012; QIU et al., 2013; DONIN et al., 2014).

No entanto, a infecção do trato gastrointestinal dos suínos por cepas virais aparentemente não patogênicas de alguns sorotipos de PEVs podem ser responsáveis por

interferência nos parâmetros produtivos e perdas econômicas, especialmente em coinfeções com doenças imunossupressoras como, por exemplo, a circovirose suína, podendo resultar em infecção do sistema nervoso central (SNC) e desencadear o aparecimento de sinais clínicos nos animais acometidos (TAKAHASHI et al., 2008; SALLES et al., 2011).

Infecções com cepas virulentas de TV-A, SV-A e EV-G seguidas por viremia também podem determinar o desenvolvimento de infecções do SNC (Figura 3) (TAKAHASHI et al., 2008; YANG et al., 2013; SCHOCK et al., 2014; YAMADA et al., 2014). Sinais clínicos como ataxia, tremores musculares, incoordenação, paralisia dos membros locomotores e decúbito, relacionados à doença neurológica são comumente observados na suinocultura, porém em inúmeros casos permanecem com a causa indeterminada (BUKOVSKY et al., 2007).

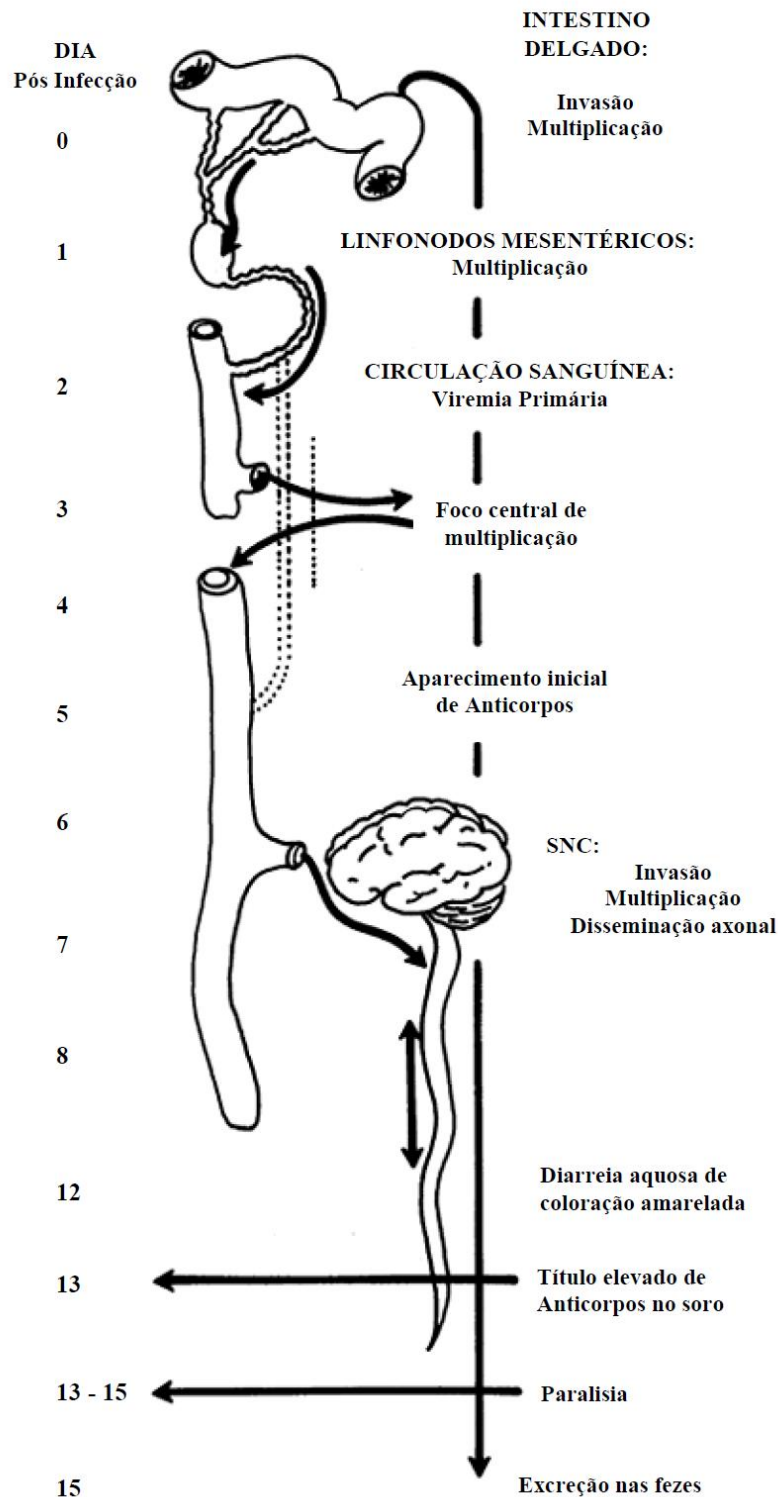


Figura 3. Ilustração esquemática da patogênese dos PEVs. Os vírus penetram pelo trato gastrointestinal e replicam-se localmente nos sítios iniciais de implantação viral (tonsilas e placas de *Peyer*) ou nos linfonodos que drenam estes tecidos. Disseminam-se pela corrente sanguínea para outros tecidos suscetíveis, principalmente linfonodos, músculos e sistema nervoso central (SNC), por meio dos nervos periféricos ou craniais. Se ocorrer alta taxa de replicação viral no SNC, neurônios motores são destruídos e ocorre paralisia. Os PEVs podem ser identificados principalmente nas tonsilas e nas fezes, que colaboram para a disseminação dos mesmos no ambiente.

Fonte: Adaptado de RACANIELLO (2007) e YAMADA et al. (2014).

O único hospedeiro natural conhecido para os PEVs é o suíno e uma das razões para a sua ampla distribuição nos rebanhos é a eficiente transmissão entre os animais suscetíveis e infectados, principalmente pela via fecal-oral (JIMENEZ-CLAVERO et al., 2003). No epitélio do trato gastrointestinal os PEVs sofrem replicação, principalmente no intestino grosso e no íleo, onde a infecção ocorre com maior frequência do que na porção superior do intestino delgado, sendo provável a replicação no tecido reticuloendotelial da lâmina própria do intestino (RACANIELLO, 2006).

Os PEVs são excretados em grandes quantidades nas fezes. Por não conter envelope lipídico mantêm a capacidade infectante mesmo quando expostos a solventes orgânicos ou a pH no intervalo entre 3 e 9 (RACANIELLO, 2007). Esta propriedade permite que estes vírus sejam resistentes ao pH baixo do estômago e às enzimas proteolíticas do trato digestivo, possibilita que persistam infectantes por longos períodos no ambiente em condições favoráveis e facilita a transmissão horizontal, principal forma de transmissão dos PEVs (BUITRAGO et al., 2010). Dada a capacidade de permanecer viável no ambiente, por mais de 168 dias em temperaturas de 15°C, a transmissão indireta por fômites também é possível (ROEHE e BRITO, 2012).

A transmissão vertical é provável, uma vez que podem infectar o trato reprodutivo de machos e fêmeas (HUANG et al., 1980; PENSAERT et al., 2004; VAN DUNG et al., 2014). Nas fêmeas infectadas os PEVs fazem viremia e são capazes de atravessar a barreira transplacentária, disseminando-se a partir da circulação materna para os tecidos fetais (PENSAERT et al., 2004), podendo ocasionar a síndrome SMEDI (HANDKE et al., 2012; LIN et al., 2012).

A infecção é frequentemente adquirida por leitões em idade de desmame, quando os títulos de anticorpos maternos diminuem e leitões de diferentes leitegadas são agrupados, e persiste por, ao menos, algumas semanas. No entanto, leitões de qualquer idade são amplamente suscetíveis à infecção com um vírus pertencente a um sorotipo ao qual não haviam sido previamente expostos (CHEN et al., 2012; SCHOCK et al., 2014).

2.2.1 *Teschovirus A*

O TV-A inicialmente causou epidemias devastadoras na Europa na primeira metade do século XX. Uma cepa virulenta do sorotipo 1 do TV-A (TV-A1) foi associada à encefalomielite não supurativa altamente fatal em suínos, conhecida como Doença de *Teschen*, na Tchecoslováquia, atual República Tcheca, responsável por consideráveis perdas econômicas para a suinocultura europeia entre os anos de 1930 e 1950 (LA ROSA et al., 2006; YAMADA et al., 2007). A doença caracteriza-se por um quadro de polioencefalomielite não supurativa, na maioria das vezes fatal, que acomete suínos de todas as idades (SALLES et al., 2011). Após este surto, outra cepa de TV-A1 com menor virulência e responsável por índices baixos de mortalidade, denominada *Talfan*, passou a ser identificada com maior frequência, causando polioencefalomielite de menor gravidade (LA ROSA et al., 2006; YAMADA et al., 2007).

O período de incubação do TV-A é de quatro a 28 dias e os sinais clínicos iniciais incluem febre (40-41°C) com duração de três a cinco dias, anorexia e depressão, seguidos por tremores e incoordenação, usualmente originados nos membros posteriores. Os membros tornam-se rígidos e, em seguida, pode ocorrer prostração, paralisia flácida (Figura 4 A/B), convulsões, coma e morte (YAMADA et al., 2009). Em situações da doença onde os sinais clínicos são brandos, os sinais se limitam à ataxia, com paralisia dos membros posteriores, dos quais os suínos frequentemente se recuperam completamente após 18-21 dias (YAMADA et al., 2014). Porém, em surtos ocasionados por cepas de maior virulência, a mortalidade pode atingir 75% (OIE, 2008).



Figura 4. Leitões na fase de creche positivos para TV-A apresentando prostração em função da paralisia dos membros posteriores. (A) animal manifestando interesse pelo alimento. (B) animal prostrado e sem condições de deslocar-se até o local de distribuição de alimento.
 Fonte: Cedido por Paulo Arruda, Iowa State University

A imunidade passiva é um importante mecanismo de defesa contra a infecção pelo TV-A em leitões lactentes e a redução nos níveis de anticorpos maternos pode resultar na infecção de leitões desmamados por este vírus, agravada pelo agrupamento de leitões de diferentes matrizes (ALEXANDERSEN et al., 2012). Associado ao estresse do desmame, leitões afetados pela síndrome multissistêmica do definhamento dos suínos no período pós-desmame (PMWS) têm alteração na população de células de defesa do sistema imune (DARWICH et al., 2002) e tornam-se também suscetíveis à infecção pelo TV-A no SNC (TAKAHASHI et al., 2008).

Atualmente, 13 genótipos de TV-A já foram descritos, sendo alguns associados com uma variedade de condições clínicas, incluindo polioencefalomielite, distúrbios reprodutivos nas fêmeas, doenças entéricas e pneumonia (CANO-GÓMEZ et al., 2011b; BOROS et al., 2012b). Epidemias de doenças ocasionadas pelo TV-A1 ocorreram em Taiwan, em 2000 e em 2004, quando os animais exibiram ataxia, paralisia dos membros posteriores e diarreia, semelhantes aos que ocorreram na doença de *Talfan*, na Europa em 1957 (CHIU et al., 2012). Diferentes genótipos deste vírus encontram-se de forma endêmica em muitos países (BUIRAGO et al., 2010; CANO-GÓMEZ et al., 2013; QIU et al., 2013; CHIU et al., 2014; SUN et al., 2015).

Na China, o TV-A foi associado a surtos com diferentes manifestações clínicas nos suínos (CHIU et al., 2012). O primeiro relato foi em animais com idade entre 50-70 dias que apresentavam dificuldade respiratória e diarreia aguda. Nestes animais, o TV-A

foi detectado por transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) em 90% (9/10) das amostras de fezes e órgãos coletadas. O genotipo relacionado a este surto foi o TV-A8 e, após isolamento e inoculação oral em marrãs com a mesma idade dos animais inicialmente acometidos, as fêmeas manifestaram pneumonia, diarreia, dificuldade respiratória, hipertrofia de linfonodos e morte (ZHANG et al., 2010).

Em leitões desmamados entre quatro e oito semanas de idade apresentando baixo desempenho, atraso no crescimento, distúrbios respiratórios e gastrointestinais, a taxa de detecção de TV-A pela técnica da *nested*-PCR nos diferentes tecidos corporais foi de 96,7% (29/30) (CHIU et al., 2012). Os tecidos intestinais apresentaram a maior taxa de detecção (61%), seguidos dos órgãos linfoides (59%), órgãos viscerais (37%) e SNC (32%). Dentre estes órgãos, os locais de maior detecção do vírus foram cólon, linfonodos mesentéricos, fígado, baço e porção cranial do cérebro. Com base na sequência do gene que codifica a proteína VP1 diferentes genotipos foram identificados, dentre eles TV-A1, 4, 6, 7 e 11. Adicionalmente, foi verificada a presença de mais de um genotipo de TV-A no mesmo tecido de alguns animais (CHIU et al., 2012).

Em outro surto na China, fêmeas manifestaram sinais da síndrome SMEDI, com aborto em 80 marrãs e leitões natimortos ou mortos logo após o nascimento. O TV-A foi identificado em 54 (78%) de 69 *pools* de órgãos dos animais avaliados. A genotipagem de amostras provenientes deste surto também revelou que o TV-A8 foi o genotipo envolvido no quadro clínico (LIN et al., 2012).

Taxa de detecção de 85,7% (276/322) de TV-A foi observada a partir de amostras fecais de suínos assintomáticos de quatro a oito semanas de idade na cidade de Shanghai, China. Neste estudo, verificou-se a ampla distribuição de diferentes cepas de TV-A, incluindo os genotipos 1, 2, 4, 8 e 10, além da detecção de um possível novo genotipo do vírus (SUN et al., 2015).

A coinfeção entre TV-A e outros agentes virais também é frequente. Em um estudo realizado na China, amostras de soro coletadas de suínos manifestando febre alta (39-41°C) foram investigadas para diferentes agentes virais, incluindo o *Vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos* (PRRSV), *Vírus da peste suína clássica* (CSFV) e TV-A pela técnica de *multiplex*-PCR. O TV-A foi detectado em 50,9% (58/114) dos animais em infecção singular, seguido pelo PRRSV (36,8%) e CSFV (21,1%). A coinfeção também foi observada entre estes três agentes virais, sendo PRRSV + TV-A a mais frequente (34,2%) (QIU et al., 2013).

Em outro estudo realizado nesse mesmo país utilizando a técnica de *multiplex-PCR* para a investigação de *Circovirus suíno-2* (PCV2), TV-A e *Virus da gastroenterite transmissível* (TGEV) em 127 amostras de tecidos de suínos demonstrando febre alta (39-41°C), o TV-A em infecção singular foi detectado em 60 (46,9%) amostras. A coinfeção com TV-A e os outros dois vírus pesquisados foi observada em 34 (26,8%) amostras (WANG et al., 2013).

No Japão, o TV-A foi identificado como agente etiológico de encefalite em leitões de 40 dias de idade que manifestavam paralisia flácida dos membros posteriores e decúbito esternal. As lesões histopatológicas observadas foram encefalomielite não supurativa no SNC, caracterizada por manguito perivascular de células mononucleares, gliose focal, necrose neuronal e neuronofagia. O isolamento viral a partir de amostras de tronco encefálico e cerebelo, seguido de RT-PCR e sequenciamento, revelou identidade de 91,2 a 95,6% entre as sequências genômicas obtidas e o TV-A (YAMADA et al., 2004; YAMADA et al., 2014).

Um estudo sobre a patogenicidade do TV-A foi conduzido no Japão, em leitões gnotobióticos de três dias de idade submetidos à inoculação oral, intranasal ou intravenosa por TV-A1 (YAMADA et al., 2014). Todos os animais desenvolveram encefalomielite, porém aqueles submetidos à inoculação oral e intranasal manifestaram lesões histopatológicas moderadas quando comparadas às lesões induzidas nos leitões inoculados por via intravenosa. A medula espinhal foi o local que apresentou lesões mais severas ao exame histopatológico. Os sinais clínicos mais comumente observados nos animais foram depressão, ataxia locomotora e paralisia flácida de um ou ambos os membros anteriores e posteriores. Alguns animais também manifestaram diarreia discreta a moderada, de coloração amarelada, tendo sido observado edema no intestino grosso ao exame. Os animais inoculados por via oral ou intranasal demonstraram total recuperação dos sinais clínicos em torno de 18-21 dias pós-infecção, provavelmente devido ao aumento no título de anticorpos. Os animais inoculados por via intravenosa apresentaram lesões mais graves aos 20 dias pós-infecção, apesar do aumento nos títulos de anticorpos, possivelmente devido ao lento desenvolvimento dos mecanismos de defesa dos leitões para prevenir as lesões no SNC causadas por TV-A1 por ocasião da grave viremia. A análise do resultado da RT-PCR demonstrou a presença de TV-A no SNC, tonsilas e intestino grosso dos animais inoculados (YAMADA et al., 2014).

No Japão, após a detecção de TV-A em células do SNC e de PCV2 em histiócitos, linfonodos e alvéolos pulmonares de um leitão com sinais de PMWS, tetraparesia, depressão e dispneia, o TV-A foi associado ao quadro de encefalomielite, o que foi atribuído à

queda nos níveis de anticorpos e imunossupressão resultante da alteração na população de células de defesa do sistema imune (TAKAHASHI et al., 2008).

Na Europa, ao pesquisar vírus potencialmente patogênicos em leitões apresentando sinais clínicos de PMWS, a prevalência do TV-A foi de 50% (7/14) em animais com idade entre sete e 10 semanas. Em todos os casos foi verificada coinfeção com o PCV2, e, em alguns deles, coinfeção com importantes agentes virais como PRRSV e *Torque teno sus virus*, porém em menor proporção de ocorrência do que o PCV2. O sequenciamento do TV-A envolvido neste caso clínico revelou identidade com o TV-A7 (VLASAKOVA et al., 2014).

Em um estudo realizado na Suíça foram investigados diferentes possíveis agentes etiológicos em fêmeas com desordens reprodutivas que apresentavam um ou mais sinais clínicos associados à síndrome SMEDI. Neste estudo o TV-A e o EV-G foram identificados em 11% (32/286) dos animais. Esta foi a primeira identificação destes vírus em tecido fetal de suínos naquele país (HANDKE et al., 2012).

Na Espanha, mediante a implantação de um programa específico de vigilância para as doenças dos suínos realizado em animais assintomáticos, o TV-A foi o vírus entérico mais abundante na população estudada. O isolamento viral por inoculação de homogêneos fecais em cultivo de células renais suínas (linhagem PK-15), seguido de métodos padrões de diagnóstico para definição dos vírus relacionados ao efeito citopático, foi observada a prevalência de 47% (97/206) de TV-A nas amostras fecais colhidas destes animais. Baseando-se nos resultados do estudo, os animais foram considerados portadores do vírus e a ausência de sinais clínicos foi associada à falta de patogenicidade intrínseca dos genótipos virais que circulavam nas populações avaliadas ou devido à imunidade adquirida pelos animais (BUITRAGO et al., 2010).

Ainda na Espanha, grande diversidade de TV-A foi observada circulando entre os suínos domésticos, não tendo sido observado um padrão de distribuição geográfica entre os genótipos identificados. Entretanto, foi relatada a circulação de diferentes genótipos numa mesma área (CANO-GÓMEZ et al., 2011b). Neste estudo, baseado na sequência completa da região VP1 do genoma viral, o TV-A12 foi descrito pela primeira vez naquele país.

Na Hungria, também com base no sequenciamento da região genômica que codifica a proteína VP1, foi possível a primeira identificação do TV-A13 em javalis. A ocorrência de uma cepa geneticamente distante dos vírus identificados nos animais domésticos foi apontada como fator de risco para as criações de suínos, podendo contribuir

para a infecção de leitões de diferentes idades suscetíveis a um genotipo ao qual não foram previamente expostos (BOROS et al., 2012b).

No continente americano, o TV-A foi relatado em poucos países. No Canadá, encefalomielite causada pela infecção por TV-A1 foi descrita em suínos com idade entre quatro e sete semanas apresentando sinais de ataxia e paralisia nos membros posteriores (SALLES et al., 2011).

Nos EUA, o TV-A foi detectado inicialmente em amostras de fezes diarreicas (PALMQUIST et al., 2002). Em 2003, o vírus foi identificado em um rebanho do estado de Indiana que apresentava taxa de mortalidade de 4,5% em leitões desmamados manifestando sinais neurológicos, com membros enrijecidos, decúbito lateral, tremores e paralisia. O TV-A1 foi detectado em amostras de cérebro e medula espinhal desses animais. Nesse mesmo estudo, a avaliação sorológica longitudinal de matrizes e leitões verificou alto título de anticorpos maternos, 64 a 128, nos leitões aos 6-7 dias de idade, declinando aos 22 dias de idade para 4 a 8, levando à conclusão de que a presença dos sinais clínicos e mortalidade dos leitões eram coincidentes com o declínio na quantidade de anticorpos contra TV-A (POGRANICHNIY et al., 2003). Posteriormente, a análise genética dos genotipos de TV-A1 circulantes em Indiana foi realizada, comprovando baixa heterogeneidade genética dos vírus pesquisados neste surto com as sequências de referência depositadas em bases públicas de dados, indicando presença endêmica de TV-A em rebanhos suínos naquele estado (BANGARI et al., 2010).

Ainda nos EUA, o TV-A foi identificado em amostras fezes diarreicas e de consistência normal de suínos, com frequência de ocorrência de 36% (13/36), sem diferença significativa nas taxas de detecção de acordo com a consistência fecal (SHAN et al., 2011).

Na República Dominicana, um grave surto de encefalomielite foi registrado em suínos. Entre as 54 amostras de soro avaliadas de animais com sinais clínicos como incoordenação, opistótono e paralisia dos membros posteriores, 20 foram positivas para o TV-A (37%). Além das avaliações sorológicas, amostras de cérebro e medula espinhal foram coletadas de sete animais, e seis delas foram positivas para TV-A. A análise filogenética da P1 do TV-A identificado neste surto revelou se tratar de TV-A1. Este foi o primeiro surto relatado naquele país relacionado a cepa de TV-A virulenta, e a suspeita era que estivesse relacionado à presença de outros agentes infecciosos na população suína como CSFV, PCV2 e PRRSV, que com seu efeito imunossupressor facilitaram a manifestação do TV-A (VENTURA et al., 2013).

No Brasil, escassos estudos relativos a presença de TV-A nos rebanhos suínícolas foram conduzidos. Em um estudo longitudinal realizado no estado do Paraná a partir de amostras de fezes de leitões lactentes (1-3 semanas de idade) e desmamados (4-8 semanas de idade) verificou-se a ausência de excreção de TV-A nos animais na maternidade. Nos animais na fase de creche, o TV-A foi detectado em 70,5% (12/17) dos animais, todos apresentando infecções mistas com o EV-G (SILVA, 2015).

2.2.2 Sapelovirus A

O SV-A passou a ser identificado com maior frequência nos rebanhos suínos domésticos e em javalis após a padronização da *nested*-PCR que permitiu identificar e classificar os PEVs (KRUMBHOLZ et al., 2003; LA ROSA et al., 2006).

Durante um programa de mapeamento da doença vesicular dos suínos em diferentes regiões geográficas da Itália, o SV-A foi identificado em 42,4% (14/33) das amostras de fezes de suínos assintomáticos (LA ROSA et al., 2006), tendo sido o segundo PEV mais frequente nestes animais. Ainda neste país, o SV-A foi identificado em amostras fecais coletadas de animais saudáveis, porém sempre em coinfeção com TV-A e/ou EV-G na frequência de 25,4% (14/55) (SOZZI et al., 2010). Já na Espanha, durante pesquisa de adenovírus e picornavírus em fezes de suínos assintomáticos, a detecção do SV-A foi de apenas 9% (18/206) (BUITRAGO et al., 2010).

O SV-A foi o segundo membro da família *Picornaviridae* mais encontrado (53%, 19/36) em fezes diarreicas e normais de suínos nos EUA. Infecções mistas com diversos outros vírus, dentre eles, o EV-G (80%) e TV-A em (36%) também foram detectadas (SHAN et al., 2011).

Na China, o SV-A foi isolado em leitões com 50-60 dias de idade apresentando dificuldade respiratória, diarreia aguda, ataxia, paralisia nos membros locomotores e morte (LAN et al., 2011). Vários patógenos que comumente são associados a estes quadros clínicos foram investigados, incluindo o TV-A, SV-A, EV-G, rotavírus suíno grupos A e C, PCV2, PRRSV, PEDV, *Herpesvirus suíno 1*, calicivírus, astrovírus, parvovírus, *Vírus da peste suína clássica* e TGEV, e as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* tipo C, *Leptospira spp*, *Streptococcus sp*, *Listeria sp*, *Brucella spp* e *Mycoplasma sp*. De todos os patógenos pesquisados nos 17 leitões, o SV-A foi detectado em todos os animais; apenas um dos animais avaliados foi positivo para o PCV2. Após a avaliação do CPE em células renais suínas (PK-15); observação das características morfológicas do vírus mediante microscopia eletrônica; realização de RT-PCR utilizando *primers* específicos para SV-A; sequenciamento; determinação da sequência genômica completa da cepa e inoculação da cepa isolada em leitões da mesma idade daqueles naturalmente acometidos, concluiu-se que o SV-A foi o agente viral causal do quadro clínico descrito (LAN et al., 2011). Os sinais clínicos, bem como as lesões observadas à necropsia, foram semelhantes aos observados em infecção experimental por TV-A (YAMADA et al., 2009).

Também na China, o SV-A foi detectado e teve sua sequência genômica completa estabelecida em amostras fecais diarreicas de leitões lactentes, sugerindo o possível envolvimento do vírus em quadros de diarreia aguda. Nestes animais, outros patógenos entéricos como PEDV, rotavírus suíno grupos A e C, TGEV, *Aichivirus C* e PCV2 foram detectados em diferentes frequências (CHEN et al., 2012).

Em outro estudo realizado na China, foram avaliadas por meio da técnica de PCR quantitativa 73 amostras de fezes de suínos, das quais 66 eram diarreicas. O SV-A foi detectado em 63% (46/73) dos animais que apresentavam diarreia, não sendo detectado nos animais assintomáticos (CHEN et al., 2014).

Em amostras de fezes diarreicas de suínos da Coreia do Sul foi observada prevalência de 34% de SV-A concomitantemente à infecção com outros agentes entéricos (vírus e bactérias), incluindo TV-A e EV-G. A análise do gene que codifica a proteína VP1 revelou grande diversidade genética entre as cepas de SV-A circulantes naquele país (SON et al., 2014). Esse estudo indicou infecção endêmica por SV-A em suínos com diarreia e revelou que a coinfeção por outros patógenos, em especial o EV-G, é comum nestas situações. A partir dos resultados obtidos, os autores sugeriram que o SV-A pode desempenhar um importante papel como agente etiológico de diarreia (SON et al., 2014).

No Reino Unido, o SV-A foi relatado como agente etiológico de polioencefalomielite em leitões de 21-28 dias em um surto de doença neurológica em que os animais apresentavam sinais de ataxia e paraparesia (SCHOCK et al., 2014).

Em um estudo realizado na Espanha, foram coletadas amostras fecais de javalis assintomáticos das quais 6,4% (4/63) foram positivas na RT-PCR para SV-A em coinfeção com TV-A (CANO-GÓMEZ et al., 2013). O agente mais frequentemente encontrado nas amostras avaliadas foi o TV-A (50,8%, 32/63). Estes resultados são semelhantes aos resultados de um estudo de prevalência em suínos domésticos realizado também na Espanha, em que se verificou SV-A e TV-A em 9% e 47% das 206 amostras fecais avaliadas, respectivamente (BUITRAGO et al., 2010).

Em amostras fecais coletadas de javalis no Japão, 12,5% (6/48) foram positivas para SV-A (ABE et al., 2011) em infecção singular. Na República Tcheca, o SV-A foi identificado em fezes de javalis assintomáticos em coinfeção com TV-A e/ou EV-G em 27% das amostras avaliadas (19/72) (PRODELALOVA, 2012).

2.2.3 Enterovirus G

Estudos realizados na Itália revelaram que o EV-G é endêmico naquele país, entretanto as taxas de detecção podem variar. Em fezes coletadas de suínos assintomáticos o EV-G foi detectado por RT-PCR em 45,5% (15/33) das amostras (LA ROSA et al., 2006), enquanto em outro estudo, igualmente baseado na coleta de amostras fecais de animais assintomáticos, o EV-G foi detectado por RT-PCR em 12,73% (7/55) das amostras avaliadas (SOZZI et al., 2010).

Na Hungria, a presença do EV-G foi investigada em amostras de sangue e fezes de suínos com 10 dias de idade e suínos com um a três meses de idade por meio da técnica de RT-PCR. As amostras de sangue apresentaram resultados negativos para o vírus, indicando ausência de viremia naqueles animais no momento da coleta das amostras. Já nas 15 amostras de fezes de leitões com 10 dias de idade avaliadas, em seis (40%) foi possível identificar o RNA viral do EV-G. Nenhuma das amostras de fezes dos animais entre um e três meses de idade foram positivas para o vírus. Baseando-se nesses resultados, os autores sugeriram que o EV-G pode apresentar um ciclo de infecção relativamente curto (BOROS et al., 2011).

Contrariamente, na República Tcheca, o EV-G foi detectado com frequência de 92% (23/25) em animais desmamados (4 a 12 semanas) e de 20% (8/40) em suínos adultos (6 meses) (PRODELALOVA, 2012). Neste estudo, foi observada prevalência de 50,2% (104/207) de EV-G em suínos domésticos e 69,4% (50/72) em javalis, tendo sido o agente viral mais frequentemente detectado em ambos os grupos.

Em um estudo conduzido na Hungria a partir de amostras fecais de javalis assintomáticos, o EV-G foi detectado em duas de cinco amostras nos animais com seis semanas de idade e em três de cinco amostras nos animais com oito semanas de idade. A análise filogenética do genoma completo do vírus detectado permitiu a sua classificação como um novo genótipo, denominado EV-G15. Os resultados alertam para a possibilidade de javalis selvagens atuarem como reservatório do vírus (BOROS et al., 2012a).

Na Coreia, o EV-G foi isolado em uma granja comercial de leitões lactentes assintomáticos (MOON et al., 2012). A determinação da sequência genômica completa do vírus demonstrou alta identidade (77,9%) com a amostra UKG/410/73 detectada na Hungria (KRUMBHOLZ et al., 2002).

Na China, a sequência genômica completa de um enterovírus detectado a partir de uma amostra fecal suína apresentou 82,4% de identidade com as cepas de EV-G9 e

77,5% de identidade com EV-G10 (ZHANG et al., 2012). Os autores sugeriram que a recombinação existe entre os diferentes PEV e demonstraram a existência de diferentes cepas circulantes nos rebanhos de suínos daquele país.

Na China, foi verificada a prevalência de 8,3% (37/447) de EV-G9 em propriedades de criação de suínos a partir de amostras fecais obtidas de animais assintomáticos de diferentes faixas etárias (YANG et al., 2013). Animais com 10 a 15 semanas de idade apresentaram maior frequência de detecção (10,1%, 12/119), enquanto animais acima de 20 semanas de idade apresentaram baixa frequência (4,9%, 5/103). Mediante a inoculação experimental em suínos de duas semanas de idade e livres de patógenos específicos, o grupo de pesquisa demonstrou que a cepa de EV-G isolada era virulenta e capaz de causar febre e paralisia flácida dos membros posteriores, que foi reproduzida em dois dos 12 animais inoculados. Adicionalmente, foi possível demonstrar a ocorrência de recombinações genéticas entre as cepas de EV-G circulantes em um mesmo rebanho (YANG et al., 2013).

No Vietnã, a investigação da presença de EV-G em amostras de fezes normais e diarreicas de leitões recém-desmamados e com mais de um ano de idade revelou que aproximadamente 90% (92/102) dos animais estavam excretando o vírus no momento da coleta, não sendo encontrada diferença significativa de acordo com a consistência da amostra fecal. A taxa de infecção entre os animais com 7 a 14 semanas de idade foi de 93% (54/58) e declinou moderadamente dentre os animais acima de um ano de idade, onde a taxa de detecção do RNA viral foi de 40% (24/60). Além da alta frequência de infecção por EV-G, observou-se que os animais adultos continuaram eliminando o vírus, sendo identificada grande diversidade genética e taxas de recombinação entre as cepas virais, o que sugere a circulação de maior número de genótipos de EV-G nos rebanhos vietnamitas (VAN DUNG et al., 2014).

As altas taxas de infecção dos leitões jovens demonstradas nos diferentes estudos refletem a exposição ambiental a diferentes fontes de infecção e a suscetibilidade de infecção por diferentes genótipos de EV-G circulantes. Na Bolívia, um novo genótipo de EV-G foi identificado pelo sequenciamento do gene que codifica a proteína VP1 do vírus, identificado a partir de amostra fecal suína (NIX et al., 2013).

Nos EUA, o EV-G foi identificado em uma amostra fecal diarreica de suíno; a análise de sequenciamento demonstrou maior identidade de nucleotídeos com EV-G1 (ANBALAGAN et al., 2014). Este foi o primeiro relato de EV-G nos EUA, e sugere a recente

introdução deste agente no país, já que trabalhos anteriores não o detectaram (PALMQUIST et al., 2002).

No Brasil, o EV-G foi o picornavírus entérico mais frequente em fezes de leitões assintomáticos com idade entre 4 – 8 semanas. O EV-G foi o único PEV identificado em infecção singular em 11,7% (2/17) das amostras avaliadas. Infecções mistas com EV-G e TV-A (3/17) e EV-G, TV-A e SV-A (9/17) também foram observadas nestes animais (SILVA, 2015).

2.3 INFECÇÕES MISTAS PELOS PICORNAVÍRUS ENTÉRICOS SUÍNOS

Em grande parte dos estudos relacionados aos PEVs, houve a investigação concomitante de TV-A, SV-A e EV-G. Grande ocorrência de infecções mistas por estes agentes tem sido identificada (Tabela 1), associada muitas vezes a outros agentes virais comumente excretados pelas fezes dos suínos.

Tabela 1. Frequência de ocorrência de TV-A, SV-A e EV-G, mediante pesquisa simultânea destes agentes, em suínos domésticos (SD) e javalis (J) assintomáticos, em diferentes países. Todos os estudos utilizaram amostras de fezes de consistência normal para a identificação dos agentes virais em infecção singular e/ou mista.

País	Frequência de infecção singular (%)			Frequência de infecções mistas (%)				Referência
	TV-A	SV-A	EV-G	TV-A + SV-A	TV-A + EV-G	SV-A + EV-G	TV-A + SV-A + EV-G	
Itália (SD)	12,1	42,4	45,5	-	-	-	-	LA ROSA et al. (2006)
Itália (SD)	52,5	2,5	7,5	27,5	5	5	-	SOZZI et al. (2010)
Espanha (SD)	47	9	-	-	-	-	-	BUITRAGO et al. (2010)
EUA (SD)	2,7	2,7	13,8	-	16,6	36,1	13,8	SHAN et al. (2011)
República Tcheca (SD)	12,1	-	18,5	4	12,9	4	48,4	PRODELALOVA (2012)
Brasil (SD)	-	-	11,7	-	17,6	-	52,9	SILVA (2015)
República Tcheca (J)	8,9	1,8	25	-	30,4	16,1	17,9	PRODELALOVA (2012)
Espanha (J)	50,8	-	NP*	6,4	-	-	-	CANO-GÓMEZ et al. (2013)

* NP - Não pesquisado

No estudo realizado na República Tcheca, foram avaliados tanto suínos domésticos quanto javalis, no entanto a prevalência dos vírus foi semelhante entre os dois grupos de animais. Em 69,4% (86/124) dos suínos domésticos e 64,3% (36/56) dos javalis, os animais apresentavam infecção simultânea com dois ou até mesmo três dos vírus pesquisados. Este estudo demonstrou que o TV-A, o SV-A e o EV-G ocorrem comumente em rebanhos de suínos domésticos, com prevalência similar nos criatórios comerciais de javalis, sugerindo a possibilidade de transmissão entre javalis e suínos domésticos (PRODELALOVA, 2012).

2.4 DIAGNÓSTICO DE TV-A, SV-A E EV-G

O diagnóstico do TV-A, SV-A e EV-G é negligenciado em diversas situações, mesmo sendo agentes etiológicos relacionados a distúrbios neurológicos e transtornos reprodutivos, entéricos, pulmonares e lesões atípicas de pele. As justificativas podem ser a identificação frequente destes agentes em animais assintomáticos, subestimando o potencial patogênico dos vírus; além da associação destes agentes como patógenos exclusivamente entéricos, dada a grande detecção em amostras de fezes de animais sintomáticos e assintomáticos (LA ROSA et al., 2006; BUITRAGO et al., 2010). As dificuldades na detecção e diagnóstico deste vírus também eram razões para negligenciar o diagnóstico de infecções por PEVs; porém, a aplicação de técnicas moleculares de diagnóstico facilitou a pesquisa e identificação destes agentes.

Tradicionalmente as infecções por PEVs eram investigadas por métodos diagnósticos laboriosos e demorados, como o isolamento viral em cultivos celulares seguidos por diferenciação dos sorotipos por vírus neutralização, teste de fixação de complemento ou de imunofluorescência indireta (PALMQUIST et al., 2002; LA ROSA et al., 2006). O cultivo em células renais de suínos (PK-15), com a observação do CPE é sugestivo da presença de PEVs. A pesquisa sorológica para a detecção de anticorpos de PEVs por imunofluorescência indireta apresenta alta especificidade e sensibilidade (QIU et al., 2013).

O exame histopatológico é importante ferramenta auxiliar no diagnóstico. As lesões histológicas observadas em suínos infectados experimentalmente pelo TV-A se localizam principalmente no SNC (mesencéfalo, ponte, medula oblonga e medula espinhal), sendo que as lesões mais graves ocorrem na medula espinhal. As alterações são caracterizadas por encefalomielite não supurativa consistindo de manguito perivascular de células mononucleares, gliose focal e necrose neuronal. Nos animais que apresentam diarreia, edema, redução da espessura da parede intestinal e flacidez são alterações observadas no intestino grosso. No pulmão, pneumonia intersticial com infiltração de macrófagos pode ocorrer em diferente intensidade nos animais (YAMADA et al., 2014).

As lesões em suínos infectados experimentalmente por SV-A se concentram principalmente no intestino, pulmões e cérebro. A mucosa do intestino delgado apresenta intensa congestão, com pronunciada redução na altura das vilosidades. O pulmão apresenta consolidação nos lobos inferiores e pontos hemorrágicos no lobo superior. No SNC, hemorragia e hiperemia pode ser observada na duramater e vacuolização neuronal no cérebro associada a manguitos perivasculares (LAN et al., 2011). Já em animais infectados

experimentalmente por EV-G vacuolização neuronal no tecido cerebral e enfisema pulmonar podem ser observados ao exame histopatológico (YANG et al., 2013).

A presença dos antígenos de PEVs pode ser determinada mediante o exame de imunistoquímica. Este método de detecção de antígenos virais em tecidos previamente fixados permite identificar e localizar os antígenos dentro das células e tecidos e representa uma ferramenta útil dada a simplicidade e rapidez, revelando o tropismo dos PEVs e a sua patogênese (YAMADA et al., 2008). Antígenos de TV-A foram encontrados no citoplasma de células neuronais e da glia distribuídos na medula espinhal ventral e tronco cerebral, e também no citoplasma de células ganglionares no gânglio espinhal, em leitões de 40 dias de idade infectados naturalmente por TV-A1, manifestando sinais neurológicos que incluíam paralisia dos membros posteriores e decúbito. Marcação positiva para os antígenos de TV-A foi observada igualmente no citoplasma das células endoteliais destes tecidos, nas células do tecido epitelial bronquiolar do pulmão e citoplasma de alguns hepatócitos (YAMADA et al., 2008). Em infecções experimentais de leitões de três semanas de idade inoculados intravenosamente com TV-A foram detectados antígenos no citoplasma de células ganglionares no gânglio espinhal, de neurônios da medula espinhal ventral e do tronco cerebral, sendo os sítios de detecção de antígenos correspondentes aos observadas nos animais infectados naturalmente (YAMADA et al., 2009). Em infecção experimental em leitões gnotobióticos inoculados com TV-A aos três dias de idade antígenos foram principalmente detectados no SNC, nos mesmos locais observados em infecções naturais ou experimentais anteriormente descritas por YAMADA et al. (2008 e 2009). Adicionalmente, marcação positiva para antígenos de TV-A foi observada nas células epiteliais das tonsilas, células do epitélio bronquiolar dos pulmões, citoplasma de hepatócitos, e no plexo nervoso mioentérico do intestino delgado e intestino grosso (YAMADA et al., 2014).

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, a partir da década de 90, facilitou e aumentou a detecção de vírus entéricos (Tabela 2). Desde que adequadamente padronizados, os métodos baseados na RT-PCR oferecem inúmeras vantagens na detecção dos PEVs por sua alta sensibilidade e especificidade, bem como rapidez na execução do teste (LIU et al., 2011). Outra vantagem da RT-PCR é a possibilidade de diferenciação de espécies virais por meio da utilização de diferentes oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos ou de métodos complementares, como a clivagem do fragmento amplificado com enzimas de restrição, seguidos pelo sequenciamento genômico, ou seja, pela determinação da sequência de nucleotídeos do fragmento genômico amplificado (REN et al., 2012). Com o objetivo de aumentar a sensibilidade, ou até mesmo para a detecção simultânea de diferentes espécies

virais, foram desenvolvidas variações nas técnicas convencionais de PCR, tais como a *nested-PCR* e a *multiplex-PCR*. Atualmente, visando não apenas identificar um vírus presente em uma amostra biológica, mas quantificar a carga viral, o uso da técnica denominada PCR quantitativa (*qPCR*) tem sido intensificado (CANO-GÓMEZ et al., 2011a).

Tabela 2. Técnicas de diagnóstico molecular de PEVs empregadas em suínos domésticos em diferentes amostras, com objetivo de (C) confirmação de diagnóstico laboratorial após avaliações prévias como lesões microscópicas ou efeito citopático viral, ou (I) investigação da presença dos vírus em criatórios de suínos.

País	Técnica	Amostra biológica	No. de amostras avaliadas/no. de amostras positivas (%)	Objetivo	Referência
EUA	RT-PCR	Fezes diarreicas	14/14 (100)	(C)	PALMQUIST et al. (2002)
EUA	RT-PCR	Cérebro e Medula espinhal	12/12 (100)	(C)	POGRANICHNIY et al. (2003)
Alemanha	<i>Nested-PCR</i> e <i>LightCycler</i> PCR	Cérebro e Medula espinhal	8/8 (100)	(C)	KRUMBHOLZ et al. (2003)
		Cérebro e Medula espinhal	7/8 (87,5)	(C)	
Japão	RT-PCR	Cérebro, Tronco cerebral, Cerebelo, Medula espinhal e tonsilas	4/4 (100)	(C)	YAMADA et al. (2004)
Itália	RT-PCR	Fezes normais	33/33 (100)	(C)	LA ROSA et al. (2006)
Japão	RT-PCR	Cérebro, cerebelo, medula espinhal e tonsilas	5/5 (100)	(C)	YAMADA et al. (2007)
Itália	RT-PCR	Fezes	40/40 (100)	(C)	SOZZI et al. (2010)
Itália	<i>Real-time</i> RT-PCR	Fezes	97/206 (47)	(I)	BUITRAGO et al. (2010)
	RT-PCR		66/206 (32)		
China	RT-PCR	Fezes diarreicas, fígado, pulmão e baço	9/10 (90)	(I)	ZHANG et al. (2010)
China	RT-PCR	Fezes	17/17 (100)	(I)	LAN et al. (2011)
Hungria	RT-PCR	Fezes	6/45 (13)	(I)	BOROS et al. (2011)
		Soro sanguíneo	0/45 (0)		
EUA	RT-PCR	Fezes diarreicas	30/36 (83)	(I)	SHAN et al. (2011)
China	RT-PCR	<i>Pool</i> tecidos (coração, pulmão, fígado, baço e intestino)	54/69 (78)	(I)	LIN et al. (2012)
China	RT-PCR	Cérebro, cerebelo, medula espinhal e tonsilas	21/30 (70)	(I)	CHIU et al. (2012)
	<i>Nested-PCR</i>		29/30 (96,7)		
China	RT-PCR	Cérebro, baço, coração e fígado	58/114 (50,8)	(I)	QIU et al. (2013)
República Tcheca	RT-PCR	<i>Pool</i> tecidos (linfonodos, fígado e baço)	13/115 (11)	(I)	VLASAKOVA et al. (2014)
Brasil	<i>Nested-PCR</i>	Fezes	34/14 (41,1)	(I)	SILVA (2015)

A técnica de *nested*-PCR apresenta maior taxa de detecção (29/30, 96,7%) do que a RT-PCR convencional (21/30, 70%) para os PEVs quando comparadas as taxas de detecções em um mesmo tecido (CHIU et al., 2012). Linfonodos mesentéricos e porções do jejuno e cólon intestinal são os órgãos onde a probabilidade de detecção molecular dos PEVs é maior. A identificação de PEVs no intestino ou em material fecal é indicativa da presença de infecção ativa por esses vírus nos rebanhos suínos. A detecção em linfonodos mesentéricos indica a entrada dos vírus na mucosa intestinal. Já a presença dos vírus em órgãos viscerais indica viremia e a sua presença no SNC indica passagem através da barreira hematoencefálica (CHIU et al., 2014).

Há grande interesse no diagnóstico de TV-A, SV-A e EV-G, para diferenciar as encefalomyelites e desordens reprodutivas causadas pelo TV-A das infecções pelo CSFV, *Herpesvirus suino tipo 1*, PPV e PRRSV, e as lesões de pele por EV-G de infecções com outros picornavírus associados a doenças vesiculares cutâneas, como o *Virus da febre aftosa*, *Virus da doença vesicular suína* e o recentemente detectado no Brasil, *Senecavirus A* (LEME et al., 2015). Com isto, é relevante a necessidade de incluir os PEVs no diagnóstico diferencial, e a detecção destes vírus por RT-PCR e *nested*-PCR preenche uma lacuna no diagnóstico destas enfermidades (QIU et al., 2013).

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na suinocultura tecnificada praticada no mundo e no Brasil, a ciência, a tecnologia e a produção encontram condições de caminhar lado a lado. Dessa forma foi possível observar a emergência de diversos patógenos, ou potenciais agentes patogênicos, que de um momento para o outro passaram a ter papel relevante na cadeia de produção de suínos. Este fato foi observado a partir da adoção de medidas de controle de algumas doenças que possibilitaram que outras infecções encontrassem condições favoráveis para a ocorrência e aumento na frequência de diagnóstico, implementado por técnicas mais modernas e com maior sensibilidade e especificidade. Paralelamente, a aplicação de técnicas moleculares no diagnóstico de rotina permitiu a ampliação dos conhecimentos sobre os agentes infecciosos e possibilitaram maior precisão no monitoramento sanitário dos rebanhos. Neste contexto, o maior conhecimento dos agentes patogênicos e a sua relação com os suínos é primordial para prevenir prejuízos aos sistemas de produção em situações de emergência ou reemergência dos patógenos. Porém, mesmo com os avanços obtidos na suinocultura as características epidemiológicas da infecção por alguns patógenos, como os enterovírus, ainda não foram totalmente esclarecidas. As formas de participação desses micro-organismos e seu impacto na cadeia produtiva suinícola ainda não estão completamente estabelecidas. Essa situação pode representar risco à produção de suínos, principalmente se considerarmos as complexas interações passíveis de ocorrer entre os patógenos tradicionais, emergentes e reemergentes.

O conhecimento sobre a prevalência e epidemiologia molecular de EV-G, TV-A e SV-A nos suínos domésticos ainda é um campo a ser amplamente explorado. Estudos recentes realizados na Europa, na Ásia e na América evidenciaram a ampla distribuição geográfica dos PEVs em suínos. No Brasil, há escassez de informações sobre a distribuição do PEVs nos rebanhos suinícolas e de seu papel como agente primário ou secundário em manifestações clínicas em animais imunossuprimidos ou em animais assintomáticos.

A identificação e a caracterização de PEVs em diferentes regiões do mundo são importantes para a compreensão da epidemiologia e da distribuição geográfica do vírus. Estudos incluindo os PEVs nos sistemas de diagnóstico também poderão contribuir com o conhecimento da sua associação com infecções sintomáticas em suínos e o comportamento das infecções (sintomáticas x assintomáticas) em situações de infecção singular ou coinfeções com outros agentes virais, particularmente aqueles com potencial imunossupressor.

REFERÊNCIAS

- ABE, M.; ITO, N.; SAKAI, K.; KAKU, Y.; OBA, M.; NISHIMURA, M.; KURANE, I.; SAIJO, M.; MORIKAWA, S.; SUGIYAMA, M.; MIZUTANI, T. A novel sapelovirus-like virus isolation from wild boar. **Virus Genes**, Massachusetts. v. 43, p. 243-248, 2011.
- ABPA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. 2015. Produção mundial de carne suína. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/producao-2.html>. Acesso em: 26/05/2015.
- ALEXANDERSEN, S.; KNOWLES, N. J.; DEKKER, A.; BELSHAM, G. J.; ZHANG, Z.; KOENEN, F. Picornaviruses. In: J. J. K. ZIMMERMAN, L. A.; RAMIREZ, A.; SCHWARTZ, K. J.; STEVENSON, G. W. **Diseases of Swine**. 10 ed. Ames, Iowa, Blackwell. 2012. p. 587-620.
- ANBALAGAN, S.; HESSE, R. A.; HAUSE, B. M. First identification and characterization of porcine enterovirus G in the United States. **PloS One**, Califórnia. v. 9, 2014.
- BANGARI, D. S.; POGRANICHNIY, R. M.; GILLESPIE, T.; STEVENSON, G. W. Genotyping of porcine Teschovirus from nervous tissue of pigs with and without polioencephalomyelitis in Indiana. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Missouri. v. 22, p. 594-597, 2010.
- BOROS, A.; PANKOVICS, P.; REUTER, G. Characterization of a novel porcine enterovirus in domestic pig in Hungary. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdã. v. 11, p. 1096-1102, 2011.
- BOROS, A.; NEMES, C.; PANKOVICS, P.; BIRO, H.; KAPUSINSZKY, B.; DELWART, E.; REUTER, G. Characterization of a novel porcine enterovirus in wild boars in Hungary. **Archives of Virology**, Nova York. v. 157, p. 981-986, 2012a.
- BOROS, A.; NEMES, C.; PANKOVICS, P.; KAPUSINSZKY, B.; DELWART, E.; REUTER, G. Porcine teschovirus in wild boars in Hungary. **Archives of Virology**, Nova York. v. 157, p. 1573-1578, 2012b.
- BRITO, B.; DEE, S.; WAYNE, S.; ALVAREZ, J.; PEREZ, A. Genetic diversity of PRRS virus collected from air samples in four different regions of concentrated swine production during a high incidence season. **Viruses**, Londres. v. 6, p. 4424-4436, 2014.
- BUITRAGO, D.; CANO-GOMEZ, C.; AGUERO, M.; FERNANDEZ-PACHECO, P.; GOMEZ-TEJEDOR, C.; JIMENEZ-CLAVERO, M. A. A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Missouri. v. 22, p. 763-766, 2010.
- BUKOVSKY, C.; SCHMOLL, F.; REVILLA-FERNÁNDEZ, S.; WEISSENBÖCK, H. Studies on the aetiology of non-suppurative encephalitis in pigs. **Veterinary Record**, Londres. v. 161, p. 552-558, 2007.
- CANO-GÓMEZ, C.; BUITRAGO, D.; FERNANDEZ-PINERO, J.; FERNANDEZ-

PACHECO, P.; MANSILLA, C.; AGUERO, M.; JIMENEZ-CLAVERO, M. A. Evaluation of a fluorogenic real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method for the specific detection of all known serotypes of porcine teschoviruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdã. v. 176, p. 131-134, 2011a.

CANO-GÓMEZ, C.; PALERO, F.; BUITRAGO, M. D.; GARCIA-CASADO, M. A.; FERNANDEZ-PINERO, J.; FERNANDEZ-PACHECO, P.; AGUERO, M.; GOMEZ-TEJEDOR, C.; JIMENEZ-CLAVERO, M. A. Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences. **Infection, Genetics and Evolution**, Amsterdã. v. 11, p. 2144-2150, 2011b.

CANO-GÓMEZ, C.; GARCIA-CASADO, M. A.; SORIGUER, R.; PALERO, F.; JIMENEZ-CLAVERO, M. A. Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã. v. 165, p. 115-122, 2013.

CHEN, J.; CHEN, F.; ZHOU, Q.; LI, W.; SONG, Y.; PAN, Y.; ZHANG, X.; XUE, C.; BI, Y.; CAO, Y. Complete genome sequence of a novel porcine Sapelovirus strain YC2011 isolated from piglets with diarrhea. **Journal of Virology**, Washington. v. 86, p. 10898, 2012.

CHEN, J.; CHEN, F.; ZHOU, Q.; LI, W.; CHEN, Y.; SONG, Y.; ZHANG, X.; XUE, C.; BI, Y.; CAO, Y. Development of a minor groove binder assay for real-time PCR detection of porcine Sapelovirus. **Journal of Virological Methods**, Amsterdã. v. 198, p. 69-74, 2014.

CHIU, S. C.; HU, S. C.; CHANG, C. C.; CHANG, C. Y.; HUANG, C. C.; PANG, V. F.; WANG, F. I. The role of porcine teschovirus in causing diseases in endemically infected pigs. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã. v. 161, p. 88-95, 2012.

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

DARWICH, L.; SEGALÉS, J.; DOMINGO, M.; MATEU, E. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and Porcine Circovirus type 2 load in lymphoid tissues. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington. v. 9, p. 236-242, 2002.

DOMINGO, E.; HOLLAND, J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. In: S. S. MORSE. **Evolutionary Biology of Viruses**. Nova York, Raven Press. 1994. p. 161-184.

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

HANDKE, M.; ENGELS, M.; PROHASKA, S.; KELLER, CH; BRUGNERA, E.; SYDLER, T.; SIDLER, X. Infection related fertility disorders in Swiss pig breeding farms at the end of the postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) epizooty. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, Berna. v. 154, p. 437-444, 2012.

HUANG, J.; GENTRY, R. F.; ZARKOWER, A. Experimental infection of pregnant sows with porcine enteroviruses. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago. v. 41, p. 469-473, 1980.

HYYPÄÄ, T.; HOVI, T.; KNOWLES, N. J.; STANWAY, G. Classification of enteroviruses based on molecular and biological properties. **Journal of General Virology**, Londres. v. 78, p. 1-11, 1997.

ICTV. 2015. International Committee on Taxonomy of Viruses Disponível em: <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 22/08/2015.

JIMENEZ-CLAVERO, M. A.; FERNANDEZ, C.; ORTIZ, J. A.; PRO, J.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V.; ROBLAS, N.; LEY, V. Teschoviruses as indicators of porcine fecal contamination of surface water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 69, p. 6311-6315, 2003.

KAKU, Y.; YAMADA, S.; MURAKAMI, Y. Sequence determination and phylogenetic analysis of RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of the porcine enterovirus 1 (PEV-1) Talfan strain. **Archives of Virology**, Nova York. v. 144, p. 1845-1852, 1999.

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

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

KWIT, K.; POMORSKA-MOL, M.; MARKOWSKA-DANIEL, I. Pregnancy outcome and clinical status of gilts following experimental infection by H1N2, H3N2 and H1N1pdm09 influenza A viruses during the last month of gestation. **Archives of Virology**, Nova York, 2015.

LA ROSA, G.; MUSCILLO, M.; DI GRAZIA, A.; FONTANA, S.; IACONELLI, M.; TOLLIS, M. Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses. **Journal of Veterinary Medicine. B**, Berlim. v. 53, p. 257-265, 2006.

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

LEME, R. A., ZOTTI, E., ALCÂNTARA, B. K., OLIVEIRA, M. V., FREITAS, L. A., ALFIERI, A. F., ALFIERI, A. A. *Senecavirus A*: an emerging vesicular infection in Brazilian pig herds. **Transboundary and Emerging Diseases**, Berlim. 2015. doi: 10.1111/TBED.12430. (No prelo).

LEWIS-ROGERS, N.; CRANDALL, K. A. Evolution of Picornaviridae: an examination of

phylogenetic relationships and cophylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando. v. 54, p. 995-1005, 2010.

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

LIU, S.; ZHAO, Y.; HU, Q.; LV, C.; ZHANG, C.; ZHAO, R.; HU, F.; LIN, W.; CUI, S. A multiplex RT-PCR for rapid and simultaneous detection of porcine teschovirus, classical swine fever virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. **Journal of Virological Methods**, Amsterdã. v. 172, p. 88-92, 2011.

LIU, Y.; MA, T.; LIU, J.; ZHAO, X.; CHENG, Z.; GUO, H.; WANG, S.; XU, R. Bioinformatics analysis and genetic diversity of the poliovirus. **Journal of Medical Microbiology**, Londres. v. 63, p. 1724-1731, 2014.

MA, M.; ANDERSON, B. D.; WANG, T.; CHEN, Y.; ZHANG, D.; GRAY, G. C.; LU, J. Serological evidence and risk factors for swine influenza infections among chinese swine workers in Guangdong Province. **PLoS One**, São Francisco. v. 10, p. 01-13, 2015.

MACLACHLAN, N. J.; DUBOVI, E. J. Picornaviridae. In: N. J. M. J. DUBOVI. **Fenner's Veterinary Virology (Fourth Edition)**. São Diego, Academic Press. 2011. p. 425-441.

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

NAPOLITANO, G. Vai faltar comida? O grande desafio das próximas décadas será alimentar a crescente população mundial. **Exame**, Academic OneFile. v. 46, p. 84, 2012.

NASRI, D.; BOUSLAMA, L.; PILLET, S.; BOURLET, T.; AOUNI, M.; POZZETTO, B. Basic rationale, current methods and future directions for molecular typing of human enterovirus. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, Londres. v. 7, p. 419-434, 2007.

NIX, W. A.; KHETSURIANI, N.; PEÑARANDA, S.; MAHER, K.; VENCZEL, L.; CSELKÓ, Z.; FREIRE, M. C.; CISTERNA, D.; LEMA, C. L.; ROSALES, P.; RODRIGUEZ, J. R.; RODRIGUEZ, W.; HALKYER, P.; RONVEAUX, O.; PALLANSCH, M. A.; OBERSTE, M. S. Diversity of picornaviruses in rural Bolivia. **Journal of General Virology**, Londres. v. 94, p. 2017-2028, 2013.

OIE, ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. Teschovirus Encephalomyelitis. In: **Terrestrial Manual**. Paris. p. 1146-1152. 2008.

PALMQUIST, J. M.; MUNIR, S.; TAKU, A.; KAPUR, V.; GOYAL, S. M. Detection of porcine teschovirus and enterovirus type II by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Missouri. v. 14, p. 476-480, 2002.

PENSAERT, M. B.; SANCHEZ, R. E. JR.; LADEKJAER-MIKKELSEN, A. S.; ALLAN, G. M.; NAUWYNCK, H. J. Viremia and effect of fetal infection with porcine viruses with

special reference to porcine circovirus 2 infection. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã. v. 98, p. 175-183, 2004.

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

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

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

RACANIELLO, V. R. One hundred years of poliovirus pathogenesis. **Virology**, Nova York. v. 344, p. 9-16, 2006.

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

REIS, R. Evolução das doenças e o controle na suinocultura moderna. In: Seminário Internacional de Aves e Suínos: Suinocultura: Saúde e Meio Ambiente, IV, Florianópolis, 2005. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2005, v.5, p.1-8.

REN, L.; ZHANG, W.; YANG, S.; SHEN, Q.; FAN, K.; HUA, X. Sequencing of a porcine enterovirus strain prevalent in swine groups in China and recombination analysis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdã. v. 159, p. 265-268, 2012.

ROEHE, P.; BRITO, W. D. Síndrome SMEDI. In: J. SOBESTIANSKY, D. E. BARCELLOS. **Doenças dos Suínos**. 2 ed. Goiânia, Cãnone Editorial 2012. p. 407-409.

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

SAUVAGE, V.; AR GOUILH, M.; CHEVAL, J.; MUTH, E.; PARIENTE, K.; BURGUIERE, A.; CARO, V.; MANUGUERRA, J. C.; ELOIT, M. A member of a new Picornaviridae genus is shed in pig feces. **Journal of Virology**, Washington. v. 86, p. 10036-10046, 2012.

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

SHAN, T.; LI, L.; SIMMONDS, P.; WANG, C.; MOESER, A.; DELWART, E. The fecal virome of pigs on a high-density farm. **Journal of Virology**, Washington. v. 85, p. 11697-11708, 2011.

SILVA, D. R. **Estudo longitudinal da excreção fecal de *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G* em leitões provenientes de uma granja localizada em Guarapuava.** 2015, 65 fls. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

SON, K. Y.; KIM, D. S.; MATTHIJNSSENS, J.; KWON, H. J.; PARK, J. G.; HOSMILLO, M.; ALFAJARO, M. M.; RYU, E. H.; KIM, J. Y.; KANG, M. I.; CHO, K. O. Molecular epidemiology of Korean porcine sapeloviruses. **Archives of Virology**, Nova York. v. 159, p. 1175-1180, 2014.

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

SUN, H.; GAO, H.; CHEN, M.; LAN, D.; HUA, X.; WANG, C.; YUAN, C.; YANG, Z.; CUI, L. New serotypes of porcine teschovirus identified in Shanghai, China. **Archives of Virology**, Nova York. v. 160, p. 831-835, 2015.

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

UPADHYAYA, S.; AYELET, G.; PAUL, G.; KING, D. P.; PATON, D. J.; MAHAPATRA, M. Genetic basis of antigenic variation in foot-and-mouth disease serotype A viruses from the Middle East. **Vaccine**, Londres. v. 32, p. 631-638, 2014.

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

VANNUCCI, F. A.; GUEDES, R. M. C. Fisiopatologia das diarreias em suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria. v. 39, p. 2233-2242, 2009.

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

VLASAKOVA, M.; LESKOVA, V.; SLIZ, I.; JACKOVA, A.; VILCEK, S. The presence of six potentially pathogenic viruses in pigs suffering from post-weaning multisystemic wasting syndrome. **BMC Veterinary Research**, Londres. v. 10, p. 221, 2014.

WANG, L.; GE, C.; WANG, D.; LI, Y.; HU, J. The survey of porcine teschoviruses, porcine circovirus and porcine transmissible gastroenteritis virus infecting piglets in clinical specimens in China. **Tropical Animal Health and Production**, Londres. v. 45, p. 1087-1091, 2013.

XU, X. G.; CHEN, G. D.; HUANG, Y.; DING, L.; LI, Z. C.; CHANG, C. D.; WANG, C. Y.; TONG, D. W.; LIU, H. J. Development of multiplex PCR for simultaneous detection of six swine DNA and RNA viruses. **Journal of Virological Methods**, Amsterdã. v. 183, p. 69-74, 2012.

YAMADA, M.; NAKAMURA, K.; KAKU, Y.; YOSHII, M.; HARITANI, M.; KOZAKURA, R.; IKEGAMI, R. Enterovirus encephalomyelitis in pigs in Japan caused by porcine teschovirus. **Veterinary Record**, Londres. v. 155, p. 2, 2004.

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

YAMADA, M.; KOZAKURA, R.; KAKU, Y.; NAKAMURA, K.; YAMAMOTO, Y.; YOSHII, M.; MIYAZAKI, A.; TSUNEMITSU, H.; NARITA, M. Immunohistochemical distribution of viral antigens in pigs naturally infected with porcine teschovirus. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio. v. 70, p. 305-308, 2008.

YAMADA, M.; KOZAKURA, R.; NAKAMURA, K.; YAMAMOTO, Y.; YOSHII, M.; KAKU, Y.; MIYAZAKI, A.; TSUNEMITSU, H.; NARITA, M. Pathological changes in pigs experimentally infected with porcine teschovirus. **Journal of Comparative Pathology**, Londres. v. 141, p. 223-228, 2009.

YAMADA, M.; MIYAZAKI, A.; YAMAMOTO, Y.; NAKAMURA, K.; ITO, M.; TSUNEMITSU, H.; NARITA, M. Experimental Teschovirus encephalomyelitis in gnotobiotic pigs. **Journal of Comparative Pathology**, Londres. v. 150, p. 276-286, 2014.

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

YUE, F.; CUI, S.; ZHANG, C.; YOON, K. J. A multiplex PCR for rapid and simultaneous detection of porcine circovirus type 2, porcine parvovirus, porcine pseudorabies virus, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in clinical specimens. **Virus Genes**, Massachusetts. v. 38, p. 392-397, 2009.

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

ZHANG, C. F.; CUI, S. J.; HU, S.; ZHANG, Z.; GUO, Q.; ZELL, R. Isolation and characterization of the first Chinese strain of porcine Teschovirus-8. **Journal of Virological Methods**, Amsterdã. v. 167, p. 208-213, 2010.

ZHANG, W.; YANG, S.; SHEN, Q.; REN, L.; SHAN, T.; WEI, J.; CUI, L.; HUA, X. Complete genome sequence of a novel porcine enterovirus strain in China. **Journal of Virology**, Washington. v. 86, p. 7008-7009, 2012.

3. OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar a presença do *Teschovirus A*, *Sapelovirus A* e *Enterovirus G* em amostras de fezes de suínos domésticos e selvagens de rebanhos suínolas brasileiros e investigar pecaris (*Pecari tajacu* e *Tayassu pecari*) como hospedeiros alternativos para estas viroses.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar por meio da RT-PCR e *nested*-PCR, com *primers* específicos para a 5'NTR do genoma viral, a presença do TV-A, SV-A e EV-G em amostras de fezes normais e diarreicas de leitões de 1 a 8 semanas de idade provenientes das três principais regiões (Sul, Sudeste e Centro-oeste) produtoras de suínos do Brasil;
- Detectar por meio da RT-PCR e *nested*-PCR, com *primers* específicos para a 5'NTR do genoma viral, a presença do TV-A, SV-A e EV-G em amostras de fezes de consistência normal de javalis jovens (2 a 7 meses de idade) e adultos (2 a 4 anos de idade) provenientes da região Oeste do estado do Paraná;
- Investigar por meio da RT-PCR e *nested*-PCR a presença do TV-A, SV-A e EV-G em amostras de fezes de consistência normal de catetos (*Pecari tajacu*) e queixadas (*Tayassu pecari*) provenientes da região Oeste do estado do Paraná;
- Verificar a faixa etária em que estes vírus são mais frequentemente detectados nos suínos domésticos e selvagens;
- Avaliar a ocorrência de infecção mista por TV-A, SV-A e/ou EV-G nos animais avaliados.

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

ARTIGO A – First report of *Porcine Teschovirus* (PTV), *Porcine sapelovirus* (PSV) and *Enterovirus G* (EV-G) in pig herds of Brazil

First report of *Porcine teschovirus* (PTV), *Porcine sapelovirus* (PSV) and *Enterovirus G* (EV-G) in pig herds of Brazil

Daiane Güllich Donin · Raquel de Arruda Leme ·
Alice Fernandes Alfieri · Geraldo Camilo Alberton ·
Amauri Alcindo Alfieri

Accepted: 6 December 2013
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2013

Abstract *Porcine teschovirus* (PTV), *Porcine sapelovirus* (PSV) and *Enterovirus G* (EV-G) have been associated with enteric, respiratory, reproductive and neurological disorders. Although Brazil is the world's fourth largest producer and exporter of pork, no information on the occurrence of PTV, PSV and EV-G infections is available for Brazilian pig herds. This study aimed to investigate the occurrence of *Porcine enteric picornavirus* infections in pig farms located in three distinct geographical regions of Brazil. Forty randomly selected diarrhoeic and normal consistency faeces of suckling ($n=22$) and nursery ($n=18$) pigs from farms located in 21 distinct cities of the Southern, Southeast, and Midwest regions of Brazil were evaluated by nested-RT-PCR assays. Suckling piglets presented the expected amplicon size for PTV (158 bp) and EV-G (313 bp) in single and mixed infections in 40.9% (9/22) of the faecal samples. PSV amplicon (212 bp) was not detected in this age group. For nursery pigs, *Porcine enteric picornaviruses* amplicons were present in 77.8% (14/18) of the faecal samples. PTV and EV-G were detected in single and mixed infections, while PSV was detected only in two samples in co-infection with PTV and EV-G in this age group. The Brazilian regions evaluated presented at least two of the tested viruses. Sequencing analysis revealed high similarities to the related viruses (95.3 to 99.2% for PTV, 94.2 to 98.5% for PSV and 86 to 100% for EV-G). For the first time

PTV, PSV and EV-G have been molecularly detected and characterised in pig faecal samples in Brazil.

Keywords *Picornaviridae* · *Porcine enterovirus* · Swine · Faeces · Nested-RT-PCR

Introduction

The *Picornaviridae* family is divided into 17 genera and includes viruses of importance in human and animal health. The viruses of this family are small, nonenveloped and have a single-stranded positive-sense RNA (ssRNA) genome (ICTV 2012). Some of the *Picornaviruses* are limited to causing infection in pigs and are considered to be important etiologic agents of poliomyelomyelitis, reproductive failure (SMEDI syndrome), vesicular diseases, myocarditis, pneumonia, febrile illness and diarrhoea (Krumbholz et al. 2003).

Porcine enteric picornaviruses were previously classified into the *Enterovirus* genus. Studies on the biological and molecular features of *Porcine enteroviruses* led to their reclassification into *Porcine teschovirus* (PTV), *Porcine sapelovirus* (PSV) and *Enterovirus G* (EV-G), each belonging to three distinct genera (Kaku et al. 2001; Zell et al. 2001; Krumbholz et al. 2002; ICTV 2012).

Pigs of all ages are susceptible to infection with *Porcine enteric picornaviruses* (Prodělalová 2012). PTV, PSV and EV-G infections are usually nonpathogenic and circulate in asymptomatic domestic pigs (Cano-Gómez et al. 2011; Prodělalová 2012) and wild boars (Boros et al. 2012; Prodělalová 2012; Cano-Gómez et al. 2013).

Occasionally, depending on the serotype involved in the infection, PTV clinical manifestations may include diarrhoea and reproductive and respiratory disorders (La Rosa et al. 2006). The most characteristic outcome of PTV infection is neurologic disease, which can be mild (Talfan disease) or

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

G. C. Alberton
Department of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Paraná,
Palotina, Paraná, Brazil

severe (Teschen disease), and is associated with the virulent strain PTV1 (Cano-Gómez et al. 2013). PSV is confirmed to replicate in the gastrointestinal epithelia and may be a causative agent of acute diarrhoea, respiratory distress and polioencephalomyelitis in pigs (Lan et al. 2011). Infections with EV-G are related to some virulent strains, which commonly cause cutaneous lesions (Knowles 1988).

Porcine enteric picornaviruses have been reported in domestic pigs and wild boars of many countries in Asia (Kaku et al. 2007; Lan et al. 2011; Lin et al. 2012; Moon et al. 2012; Zhang et al. 2012), Europe (Zell et al. 2000; La Rosa et al. 2006; Buitrago et al. 2010; Sozzi et al. 2010; Boros et al. 2011; Prodělalová 2012; Cano-Gómez et al. 2013), and North and Central America (Bangari et al. 2010; Salles et al. 2011; Shan et al. 2011; Deng et al. 2012; Ventura et al. 2013). There are no reports of PTV, PSV or EV-G infections from pigs in South American countries.

Brazil holds an important position in the international pork meat market, being the world's fourth main producer and exporter of pig meat (ABIPECS 2013). PTV, PSV and EV-G have never been molecularly detected in Brazil. The potential pathogenic role of these viruses in enteric, respiratory, neurologic and reproductive disorders in pigs makes the surveillance of infections and the determination of health status important in these pig herds. The present study describes the first molecular survey for the detection of PTV, PSV and EV-G in Brazilian pig herds.

Materials and methods

The samples included in this study belong to a collection of Brazilian pig faeces from 2010 to 2013 that were stored *in natura* at 4 °C. The faecal samples were sorted by pig age and then randomly selected within individual farms where animals were bred.

Porcine faecal samples from herds located in distinct geographical regions of Brazil were selected. Then faecal samples were chosen according to the age of the animals, and only faeces of suckling piglets (1 to 3 weeks old) and nursery pigs (4 to 8 weeks old) were included.

A total of 40 pig faecal samples from herds located in 21 distinct cities of the Southern, Southeast and Midwest regions of Brazil were evaluated. Seventeen faeces of normal consistency from suckling piglets ($n=10$) and nursery pigs ($n=7$) and 23 faeces which ranged from pasty to liquid from each pig age group (suckling piglets, $n=12$ and nursery pigs, $n=11$) were selected. The Brazilian states sampled were Rio Grande do Sul (RS, $n=9$ from six cities), Santa Catarina (SC, $n=7$ from six cities) and Paraná (PR, $n=17$ from five cities) of the Southern region; São Paulo (SP, $n=2$ from one city) and Minas Gerais (MG, $n=4$ from two cities) of the Southeast region; and

Mato Grosso do Sul (MS, $n=1$ from one city) of the Brazilian Midwest region.

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

The nucleic acid were extracted using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate extraction methods (Boom et al. 1990; Alfieri et al. 2006). The RNA was eluted in 50 μ l of ultra-pure RNase-free diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water and stored at -20 °C until use. An aliquot of ultrapure autoclaved water was used as a negative control during the nucleic acid extraction procedures.

Reverse transcription (RT) reaction was performed using a denaturation solution of 13 μ l, containing 5 μ l of extracted RNA, 500 ng of Oligo(dT)_{12–18} primer (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA) and 10 mM of total dNTP, which was incubated at 65 °C for 5 min. Subsequently, it was placed on ice for 5 min. A volume of 7 μ l of RT-mix solution containing 4 μ l of $5\times$ first-strand buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2 μ l 0.1 M DTT and 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA) was mixed to the denaturation solution and incubated at 37 °C for 50 min, followed by an inactivation reaction at 70 °C for 15 min.

Polymerase chain reactions (PCR) followed by nested-PCR (n-PCR) assays were performed for the identification of each of the viruses using specific oligonucleotide primers described by Krumbholz et al. (2003), which were designed to bind to the highly conserved 5'-non-translated (5'-NTR) region of the virus genomes.

For the n-PCR assay, reactions were separately performed for each virus in final solutions of 50 μ l containing 2 μ l first round amplification product, $1\times$ PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4 and 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM of total dNTP, 10 pMol of each primer (forward and reverse) and 2 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen™ Life Technologies, São Paulo, SP, Brazil). The reactions were performed in a thermocycler (Swift™ MaxPro Thermal Cycler, Esco Health Care Pte, Singapore) at 94 °C for 5 min for denaturation followed by 30 cycles of 94, 55, and 72 °C/1 min and a final extension at 72 °C for 7 min. The expected fragment lengths of n-PCR amplified products were 158 bp (PTV), 212 bp (PSV) and 313 bp (EV-G).

To confirm the specificity of the amplicons obtained in this study, four positive faecal samples for the evaluated viruses in single or mixed infections were selected for n-PCR amplicons sequencing analyses. To facilitate the comprehension of the results, faecal samples were named BRA/UEL1/11, BRA/UEL2/13, BRA/UEL3/13 and BRA/UEL4/13. Two amplicons for each of the viruses detected from these faecal samples were sequenced. The n-PCR amplicons were purified

by GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), quantified with Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA) and sequenced in both directions with forward and reverse primers in an ABI 3500 Genetic Analyser with the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Sequence quality analyses and consensus sequences were assembled using Phred/Phrap/CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool—BLASTn software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A phylogenetic tree based on nucleotide (nt) was obtained using the maximum likelihood statistical method based on the kimura two-parameter model (MEGA version 5.2.1), which provided statistical support via bootstrapping with 1000 replicates. Sequence identity matrix was performed using the BioEdit software version 7.1.11 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

Results

Porcine enteric picornaviruses were detected in both suckling piglet and nursery pig age groups in single and mixed infections (Table 1). Considering all of the samples, PTV was detected most frequently (45 %, 18/40), followed by EV-G (40 %, 16/40). PSV was the less (17.5 %, 7/40) common virus present in the faecal samples evaluated and was not detected in the suckling piglets.

According to the location, only 5 (PR, $n=3$ and RS, $n=2$) out of the 21 cities that had pig herds evaluated did not present positive results for the tested viruses. The Midwest region, which was represented by one pig faecal sample from MS state, presented positive results for PTV and EV-G in co-

infection. The South and the Southeast regions presented the three tested viruses.

The positive samples selected for the sequencing analysis presented single and mixed infections with two or three of the viruses (Table 2). In the sequence analyses of the n-PCR amplicons, it was possible to assemble consensus nt sequences for all of the amplified products with the expected sizes, which were confirmed to be the related viruses in similarity searches. Virus nt sequences herein were deposited in Genbank (accession numbers KF410643 and KF410644 for PSV, and KF410645 and KF410646 for EV-G), except for PTV, which is shorter than 200 bp. These PTV Brazilian sequences are available with corresponding author in this study.

The similarities between *Porcine enteric picornaviruses* nt sequences in this study and others available in GenBank varied from 95.3 to 99.2 % for PTV, 94.2 to 98.5 % for PSV and 86 to 100 % for EV-G.

The phylogenetic tree (Fig. 1) formed three well-defined clusters according to the viruses. The Brazilian strains were grouped together into related viruses, revealing the homology between PTV, PSV and EV-G 5'-NTR nt sequences of this study and other published sequences, including different genotypes of these viruses.

Discussion

This study focused on the establishment of a protocol for molecular detection of PTV, PSV and EV-G for future studies on epidemiology, pathogenesis and phylogeny of these viruses in Brazilian pig herds. Accordingly, a small number of pig faecal samples were evaluated. Pig farms located in distinct geographical regions were considered as inclusion criteria of faecal samples because the overall presence and distribution of

Table 1 Single and mixed infections with *porcine teschovirus* (PTV), *porcine sapelovirus* (PSV), and *enterovirus G* (EV-G) detected by n-PCR assays in pig faecal samples of Brazil

<i>Porcine enteric picornaviruses</i>	Age group/faecal consistency				Total ($n=40$)
	Suckling piglets ($n=22$)		Nursery pigs ($n=18$)		
	Normal ($n=10$)	Diarrhoeic ($n=12$)	Normal ($n=7$)	Diarrhoeic ($n=11$)	
PTV	–	03	–	02	05
PSV	–	–	–	–	–
EV-G	01	03	01	–	05
PTV+PSV	–	–	02	–	02
PTV+EV-G	01	01	–	04	06
PSV+EV-G	–	–	–	–	–
PTV+PSV+EV-G	–	–	03	02	05
Total	02	07	06	08	23

Table 2 Positive samples for the *porcine enteric picornaviruses* that were selected for n-PCR amplicon sequencing analysis

Faecal sample	State of origin	Age (weeks)	Consistency	<i>Porcine enteric picornaviruses</i>		
				PTV	PSV	EV-G
BRA/UEL1/11	MG	3	Diarrhoeic	+ ^a	–	–
BRA/UEL2/13	PR	6	Normal	+	+ ^a	–
BRA/UEL3/13	PR	6	Normal	+ ^a	+ ^a	+ ^a
BRA/UEL4/13	PR	8	Normal	–	–	+ ^a

nPCR nested polymerase chain reactions, PTV *Porcine teschovirus*, PSV *Porcine sapelovirus*, EV-G *Enterovirus G*, MG Minas Gerais, PR Paraná

^a Amplified products submitted to sequencing analysis

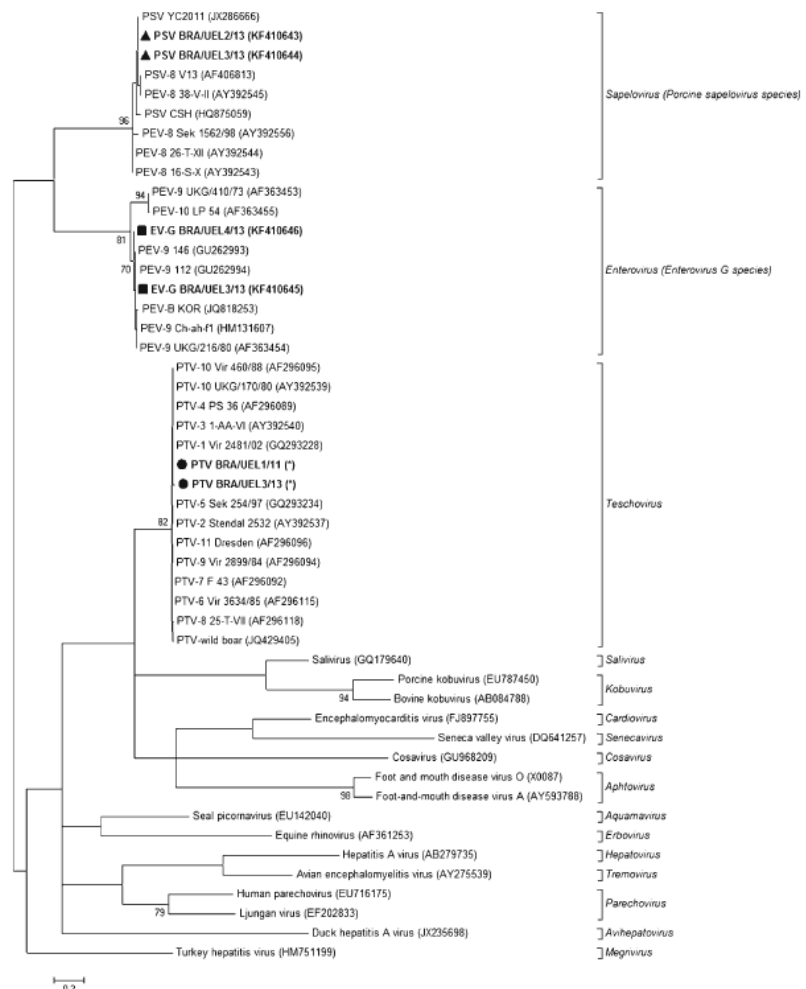
Porcine enteric picornaviruses in Brazilian pig herds was not known. However, this was a limited study and was not intended to be performed as an epidemiological survey.

The results of the first molecular screening for PTV, PSV and EV-G from faecal samples of pigs presented herein confirm the occurrence of infection by these viruses in the regions that represent the three major Brazilian pig-producing areas. Vaccinations of pig herds in Brazil are performed for years for the

prevention of viral infectious diseases, such as porcine group A *Rotavirus*, *Porcine circovirus* type 2 (PCV2) and *Porcine parvovirus*. There are no vaccines commercially available against *Porcine enteric picornavirus* infections, which discard the possibility of vaccine virus strains circulation.

The specificity of the amplicons and the genetic relationship of PTV, PSV and EV-G Brazilian wild type strains have been demonstrated. Single and mixed infections with two or

Fig 1 Genetic relationship of *Porcine teschovirus* (PTV), *Porcine sapelovirus* (PSV) and *Enterovirus G* (EV-G) of Brazilian strains and other published sequences which represent *Picornavirus* genera. Maximum likelihood phylogenetic tree construction using the kimura two-parameter model based on partial (152 nt: 1290–1442 bp) 5'-non-translated region of Brazilian strains. GenBank accession numbers of representative sequences and PTV (● BRA/UEL1/11 and ● BRA/UEL3/13), PSV (▲ BRA/UEL2/13 and ▲ BRA/UEL3/13) and EV-G (■ BRA/UEL3/13 and ■ BRA/UEL4/13) Brazilian strains presented herein are indicated between parentheses. Bootstrap values determined in 1 000 replications. (*) refer to PTV nt sequences <200 bp; these PTV Brazilian sequences are available with the corresponding author of this study



three of the tested viruses detected from a small number of suckling piglet and nursery pig faecal samples, as well as in the majority of the distinct geographical regions, may be indicative that the *Porcine enteric picornaviruses* are widespread in Brazilian pig herds.

The results presented in this study showed that suckling piglets were less frequently infected with *Porcine enteric picornaviruses*, and not presented positive results for PSV infection. However, considering that a limited number of faecal samples were evaluated, it cannot be ruled out that PSV is circulating in suckling piglets of Brazilian herds. Studies reported that PTV infection is predominant in recently weaned pigs, which is most likely due to the decrease in the titres of maternal antibodies in addition to the mixing of young piglets of different litters (Knowles 2006). Moreover, pigs of all ages might be susceptible to PTV infection with a virus serotype to which animals have not previously been exposed (Knowles 2006). The susceptibility to PSV and EV-G infections in addition to PTV in different pig age groups has also been demonstrated (Prodělalová 2012).

The PTV, PSV and EV-G have been related to different clinical disease signs, including diarrhoea (Knowles 2006; Lan et al. 2011); therefore, the faeces consistency cannot be ignored. In this study, *Porcine enteric picornaviruses* have been more frequently detected from diarrhoeic faecal samples of both pig age groups. However, it was not possible to determine an association of the virus presence and disease due to the small number of samples evaluated. Moreover, infections with other porcine enteric viruses (*Rotaviruses*, *Caliciviruses*, *Picobirnavirus*, *Aichivirus C* and *Torque teno sus virus*) were not evaluated. The PTV, PSV and EV-G RNA detection from faecal samples of diarrhoeic and/or clinically healthy piglets and weaned pigs could indicate that *Porcine enteric picornaviruses* were not always associated with the occurrence of diarrhoea.

High frequencies of *Porcine enteric picornaviruses* were reported in other studies from different countries. The presence of these viruses in single or mixed infections was not always associated to the occurrence of disease, and, therefore, different strains of PTV, PSV and EV-G are considered non-pathogenic and circulate in asymptomatic domestic pigs and wild boars (Cano-Gómez et al. 2011; Boros et al. 2012; Prodělalová 2012; Cano-Gómez et al. 2013). On the other hand, there are few pathogenic strains, primarily of PTV and PSV, which are responsible for clinical disease in affected animals (Bangari et al. 2010; Lan et al. 2011).

Porcine teschovirus 1 is known to cause neurologic disorders, but about 60 % of healthy pig population of Central Europe is seropositive for this PTV serotype (Ventura et al. 2013). Studies suggested that immunosuppression caused by infection with other viruses, such as PCV2 for example, might trigger clinical manifestations of low-to-high virulence strains of pathogenic PTV (Bangari et al. 2010; Ventura et al. 2013).

The morbidity, expression of severe clinical manifestations, and mortality rates of *Porcine enteric picornavirus* infections may be influenced by different factors, such as virulence of the virus strains involved in the infection and concomitant infection with other virus agents. Moreover, it is possible that the low morbidity and mortality reported on the field may be due to *Porcine enteric picornavirus* infections are underestimated by veterinarians and/or producers, who seek to diagnose only infectious agents classically known to cause enteric, respiratory and neurologic diseases. In many cases, only when causative agent of clinical manifestations is not identified is thought to search for other infectious agents. However, at this stage may be a lack of interest by farm workers due to infection time, costs for the diagnosis and production benefits. These reasons reinforce that studies based on the molecular epidemiology of *Porcine enteric picornaviruses* are relevant in the surveillance of these infections.

To the best of our knowledge this is the first molecular detection and characterisation of PTV, PSV and EV-G in pig herds of a South American country, and the results suggest the possibility of endemic circulation of these viruses in Brazilian pig herds. Further investigations are needed to provide additional information about the infections and molecular epidemiology of PTV, PSV and EV-G in Brazilian commercial pig herds.

Acknowledgments The authors are extremely grateful to Gefferson Almeida da Silva and Angelica Schmeing for their technical collaboration. We would like to thank the following Brazilian Institutes for financial support: the National Counsel of Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Financing of Studies and Projects (FINEP), and the Araucária Foundation (FAP/PR). Alfieri A.A. and Alfieri, A.F. are recipients of CNPq fellowships.

References

- ABIPECS Brazilian Pork Industry and Exporter Association <<http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/producao-2.html>> Accessed in: 28 July 2013
- Alfieri, A.A., Parazzi, M.E., Takiuchi, E., Médici, K.C. and Alfieri, A.F., 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998–2002, *Tropical Animal Health and Production*, 38, 521–526
- Bangari, D.S., Pogranchniy, R.M., Gillespie, T. and Stevenson, G.W., 2010. Genotyping of porcine teschovirus from nervous tissue of pigs with and without polioencephalomyelitis in Indiana, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 594–597
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M. and van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids, *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 495–503
- Boros, Á., Nemes, C., Pankovics, P., Kapusinszky, B., Delwart, E. and Reuter, G., 2012. Porcine teschovirus in wild boars in Hungary, *Archives of Virology*, 157, 1573–1578

- Boros, Á., Pankovics, P. and Reuter, G., 2011. Characterization of a novel porcine enterovirus in domestic pig in Hungary, *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 1096–1102
- Buitrago, D., Cano-Gómez, C., Agüero, M., Fernandez-Pacheco, P., Gómez-Tejedor, C. and Jiménez-Clavero, M.Á., 2010. A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22, 763–766
- Cano-Gómez, C., García-Casado, M.A., Soriguer, R., Palero, F. and Jiménez-Clavero, M.A., 2013. Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain, *Veterinary Microbiology*, 165, 115–122
- Cano-Gómez, C., Palero, F., Buitrago, M.D., García-Casado, M.A., Fernández-Pinero, J., Fernández-Pacheco, P., Agüero, M., Gómez-Tejedor, C. and Jiménez-Clavero, M.Á., 2011. Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences, *Infection, Genetics and Evolution*, 11, 2144–2150
- Deng, M.Y., Millien, M., Jacques-Simon, R., Flanagan, J.K., Bracht, A.J., Carrillo, C., Barrette, R.W., Fabian, A., Mohamed, F., Moran, K., Rowland, J., Swenson, S.L., Jenkins-Moore, M., Koster, L., Thomsen, B.V., Mayr, G., Pyburn, D., Morales, P., Shaw, J., Burrage, T., White, W., McIntosh, M.T. and Metwally, S., 2012. Diagnosis of Porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24, 671–678
- ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses <<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>> Accessed in: 03 May 2013
- Kaku, Y., Murakami, Y., Sarai, A., Wang, Y., Ohashi, S. and Sakamoto, K., 2007. Antigenic properties of porcine teschovirus 1 (PTV-1) Talfan strain and molecular strategy for serotyping of PTVs, *Archives of Virology*, 152, 929–940
- Kaku, Y., Sarai, A. and Murakami, Y., 2001. Genetic reclassification of porcine enteroviruses, *Journal of General Virology*, 82, 417–424
- Knowles, N.J., 1988. The association of group III porcine enteroviruses with epithelial tissue, *Veterinary Record*, 122, 441–442
- Knowles, N.J., 2006. Porcine enteric picornaviruses, In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D’Allaire, S. and Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of swine*, 9th ed. (Blackwell Publishing, Ames, Iowa), p. 337–345
- Krumbholz, A., Dauber, M., Henke, A., Birch-Hirschfeld, E., Knowles, N.J., Stelzner, A. and Zell, R., 2002. Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups, *Journal of Virology*, 76, 5813–5821
- Krumbholz, A., Wurm, R., Scheck, O., Birch-Hirschfeld, E., Egerer, R., Henke, A., Wutzler, P. and Zell, R., 2003. Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR, *Journal of Virological Methods*, 113, 51–63
- La Rosa, G., Muscillo, M., Di Grazia, A., Fontana, S., Iaconelli, M. and Tollis, M., 2006. Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses, *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 53, 257–265
- Lan, D., Ji, W., Yang, S., Cui, L., Yang, Z., Yuan, C. and Hua, X., 2011. Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain, *Archives of Virology*, 156, 1567–1574
- Lin, W., Cui, S. and Zell, R., 2012. Phylogeny and evolution of porcine teschovirus 8 isolated from pigs in China with reproductive failure, *Archives of Virology*, 157, 1387–1391
- Moon, H.-J., Song, D., Seon, B.H., Kim, H.-K., Park, S.-J., An, D.-J., Kim, J.-M., Kang, B.-K. and Park, B.-K., 2012. Complete genome analysis of porcine enterovirus B isolated in Korea, *Journal of Virology*, 86, 10250
- Prođelalová, J., 2012. The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011, *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1447–1451
- Salles, M.W.S., Scholes, S.F.E., Dauber, M., Strebellow, G., Wojnarowicz, C., Hassard, L., Acton, A.C. and Bollinger, T.K., 2011. Porcine teschovirus poliomyelitis in western Canada, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23, 367–373
- Shan, T., Li, L., Simmonds, P., Wang, C., Moeser, A. and Delwart, E., 2011. The fecal virome of pigs on a high-density farm, *Journal of Virology*, 85, 11697–11708
- Sozzi, E., Barbieri, I., Lavazza, A., Lelli, D., Moreno, A., Canelli, E., Bugnetti, M. and Cordioli, P., 2010. Molecular characterization and phylogenetic analysis of VP1 of porcine enteric picornaviruses isolates in Italy, *Transboundary and Emerging Diseases*, 57, 434–442
- Ventura, A., Gonzalez, W., Barrette, R., Swenson, S., Bracht, A., Rowland, J., Fabian, A., Moran, K., Mohamed, F., O’Heam, E., Jenkins-Moore, M., Toms, D., Shaw, J., Morales, P., Pyburn, D., Carrillo, C., Mayr, G., McIntosh, M. and Deng, M., 2013. Virus and antibody diagnostics for swine samples of the Dominican Republic collected in regions near the border to Haiti, *ISRN Virology*, 2013, 1–7
- Zell, R., Dauber, M., Krumbholz, A., Henke, A., Birch-Hirschfeld, E., Stelzner, A., Prager, D. and Wurm, R., 2001. Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects, *Journal of Virology*, 75, 1620–1631
- Zell, R., Krumbholz, A., Henke, A., Birch-Hirschfeld, E., Stelzner, A., Doherty, M., Hoey, E., Dauber, M., Prager, D. and Wurm, R., 2000. Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of CPE groups I–III with specific primer sets, *Journal of Virological Methods*, 88, 205–218
- Zhang, W., Yang, S., Shen, Q., Ren, L., Shan, T., Wei, J., Cui, L. and Hua, X., 2012. Complete genome sequence of a novel porcine enterovirus strain in China, *Journal of Virology*, 86, 7008–7009

ARTIGO B

ARTIGO B – Molecular survey of *porcine teschovirus*, *porcine sapelovirus* and *enterovirus G* in captive wild boars (*Sus scrofa scrofa*) of Paraná state, Brazil.

Molecular survey of porcine teschovirus, porcine sapelovirus, and enterovirus G in captive wild boars (*Sus scrofa scrofa*) of Paraná state, Brazil¹

Daiane G. Donin², Raquel de A. Leme², Alice F. Alfieri², Geraldo C. Alberton² and Amauri A. Alfieri^{2*}

ABSTRACT. Donin D.G., Leme R.A., Alfieri A.F., Alberton G.C. & Alfieri A.A. 2015. **Molecular survey of porcine teschovirus, porcine sapelovirus, and enterovirus G in captive wild boars (*Sus scrofa scrofa*) of Paraná state, Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 35(5):403-408. Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, Cx. Postal 10011, Londrina, PR 86057-970, Brazil. E-mail: alfieri@uel.br

Porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV), and enterovirus G (EV-G) are infectious agents specific to pig host species that are endemically spread worldwide. This study aimed to investigate the natural infection by these porcine enteric picornaviruses in wild boars (*Sus scrofa scrofa*) of Paraná state, Brazil, and to evaluate peccaries (*Pecari tajacu* and *Tayassu pecari*) as alternative host species for these viruses. Fecal samples (n=36) from asymptomatic wild boars (n=22) with ages ranging from 2 to 7 months old (young, n=14) and 2 to 4 years old (adult, n=8) and from peccaries (6 to 8 months old, n=14) were collected from a farm and a zoo, respectively, both located in Paraná state. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and nested-PCR (n-PCR) assays targeting the 5' non-translated region of the virus genome were used for screening the viruses. Porcine enteric picornaviruses were detected in 12 out of the 22 wild boar fecal samples. According to each of the viruses, EV-G was most frequently (11/22, 50%) detected, followed by PTV (10/22, 45.5%) and PSV (4/22, 18.2%). Regarding the age groups, young wild boars were more frequently (9/14, 64.3%) infected with PTV, PSV, and EV-G than adult animals (3/8, 37.4%). One n-PCR amplified product for each of the viruses was submitted to sequencing analysis and the nucleotide sequences were compared with the related viruses, which showed similarities varying from 97.7% to 100% for PTV, 92.4% to 96.2% for PSV, and 87.1% to 100% for EV-G. Peccaries tested negative for the viruses and in this study they did not represent infection reservoirs. This study is the first to report the molecular detection of PTV, PSV, and EV-G from captive wild boars in a South American country and the first to screen peccaries as alternative host species for porcine enteric picornavirus.

INDEX TERMS: Porcine teschovirus, PTV, porcine sapelovirus, PSV, enterovirus G, EV-G, wild boars, *Pecari tajacu*, *Sus scrofa scrofa*, *Tayassu pecari*.

RESUMO. [Estudo molecular de teschovírus suíno, sapelovírus suíno e enterovírus G em javalis (*Sus scrofa scrofa*) de cativeiro no Paraná.] *Teschovírus suíno* (PTV),

sapelovírus suíno (PSV) e *enterovírus G* (EV-G) são agentes infecciosos específicos da espécie suína que estão endemicamente disseminados em todo o mundo. O objetivo deste estudo foi investigar a infecção natural por estes picornavírus entéricos suínos em javalis (*Sus scrofa scrofa*) do estado do Paraná, Brasil e avaliar pecaris (*Pecari tajacu* e *Tayassu pecari*) como hospedeiros alternativos para estes vírus. Amostras fecais (n=36) de javalis assintomáticos (n=22) com idades de 2 a 7 meses (jovens, n=14) e 2 a 4 anos (adultos, n=8) e de pecaris (6 a 8 meses de idade, n=14) foram coletadas em um cativeiro e zoológico, res-

¹ Received on January 15, 2015.

Accepted for publication on March 5, 2015.

² Laboratório de Virologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rodovia Celso Garcia Cid, Campus Universitário, Cx. Postal 10011, Londrina, PR 86057-970, Brazil. *Corresponding author: alfieri@uel.br

³ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Rua Pioneiro 2153, Palotina, PR 85950-000, Brazil.

pectivamente, ambos localizados no estado do Paraná. A transcrição reversa seguida por reações da polimerase em cadeia (RT-PCR) e *nested*-PCR com alvo na região 5'-não traduzida do genoma viral foram utilizadas para a identificação dos vírus. Picornavírus entéricos suínos foram detectados em 12 das 22 amostras fecais de javalis. De acordo com cada um dos vírus, EV-G foi mais frequentemente (11/22, 50%) detectado, seguido pelo PTV (10/22; 45,5%) e PSV (4/22; 18,2%). Considerando os grupos de idade, javalis jovens foram mais frequentemente (9/14; 64,3%) infectados com PTV, PSV e EV-G do que os javalis adultos (3/8; 37,4%). Um produto amplificado na *nested*-PCR para cada um dos vírus foi submetido à análise de sequenciamento e as sequências de nucleotídeos foram comparadas com vírus relacionados, o que mostrou que as similaridades variaram entre 97,7% a 100% para o PTV, 92,4% a 96,2% para o PSV e 87,1% a 100% para o EV-G. Os peccaris foram negativos para as viroses investigadas e neste estudo não se apresentaram como hospedeiros alternativos para as infecções. Este estudo é o primeiro a relatar a detecção molecular de PTV, PSV e EV-G em javalis de cativeiro de um país da América Latina e o primeiro a avaliar peccaris como espécie hospedeira alternativa para picornavírus entéricos suínos.

TERMINOS DE INDEXAÇÃO: *Teschovirus suino*, PTV, *sapelovirus suino*, PSV, *enterovirus G*, EV-G, javalis, *Pecari tajacu*, *Sus scrofa scrofa*, *Tayassu pecari*.

INTRODUCTION

Porcine teschovirus (PTV), *porcine sapelovirus* (PSV), and *enterovirus G* (EV-G), also known as porcine enteric picornaviruses, are common pathogens that only cause infections in pigs. These viruses belong to the *Picornaviridae* family and are small, non-enveloped, and have a single-stranded positive-sense RNA (ssRNA) genome (ICTV 2013).

Porcine enteric picornaviruses have previously been classified in the *Enterovirus* genus, which was composed of at least 13 species, named PEV1 through PEV13. Studies on the biological and molecular features of porcine enteroviruses have led to their reclassification into 3 distinct genera. The species PEV1 to 7 and PEV11 to PEV13 have been reclassified into the genus *Teschovirus*, which is composed of different serotypes of a single species named *porcine teschovirus* (Kaku et al. 2001, Zell et al. 2001). The species PEV8 was named as *porcine enterovirus A* and was later renamed *porcine sapelovirus*, representing the unique porcine host species of the new genus *Sapelovirus* (Krumbholz et al. 2002). The species PEV9 and PEV10 have been classified into the genus *Enterovirus*, species *porcine enterovirus B* (PEV-B), which was recently renamed as *enterovirus G* (Krumbholz et al. 2003, ICTV 2013).

The majorities of the PTV, PSV, and EV-G serotypes are non-pathogenic and circulate worldwide in asymptomatic domestic pigs (Cano-Gómez et al. 2011, Prod'homme et al. 2012). However, depending on the virus serotype and infection conditions, these picornaviruses may be considered important etiological agents of enteric, respiratory, reproductive, or neurological disorders (Bangari et al. 2010, Ventura

et al. 2013). Clinical manifestations may include diarrhea, pneumonia, febrile illness, vesicular diseases, reproductive failure (SMEDI syndrome), myocarditis, and poliomyelitis (Krumbholz et al. 2003).

Studies performed in different geographical regions throughout the world revealed that PTV, PSV, and EV-G are ubiquitous and have been reported in Asia (Kaku et al. 2007, Lan et al. 2011, Lin et al. 2012, Moon et al. 2012, Zhang et al. 2012), Europe (Zell et al. 2000, La Rosa et al. 2006, Buitrago et al. 2010, Sozzi et al. 2010, Boros et al. 2011, Prod'homme et al. 2012), and the Americas (Bangari et al. 2010, Salles et al. 2011, Shan et al. 2011, Deng et al. 2012, Ventura et al. 2013, Donin et al. 2014).

The role of wild boars (*Sus scrofa scrofa*, *Suidae* family) as a reservoir of infectious disease for other domestic animals and human populations has been discussed for years (Ruiz-Fons et al. 2008, Meng et al. 2009). Wild boars are susceptible to infections by viruses that also affect domestic pigs (*Sus scrofa domesticus*), such as porcine group A rotavirus (PoRVA), porcine circovirus type 2 (PCV2), hepatitis E virus (HEV), Aujeszky disease virus (ADV), porcine parvovirus (PPV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), classical swine fever virus (CSF), torque teno sus virus (TTSuV), influenza A virus, and others (Ruiz-Fons et al. 2008, Meng et al. 2009, Okadera et al. 2013, Biondo et al. 2014). These animals are also susceptible to infections by PTV, PSV, and EV-G, which were described in asymptomatic wild boars in Hungary (Boros et al. 2012a, Boros et al. 2012b), Spain (Cano-Gómez et al. 2013), and the Czech Republic (Prod'homme et al. 2012).

The uncontrolled growth of the wild boar populations has been observed worldwide over the last decades. Wild boars can easily adapt to different food and environmental conditions, which, together with other enabling factors, favor the wide geographical distribution of this animal species (Bieber & Ruf 2005). In Brazil, there is a similar scenario, in which wild boars are present in many states, in both free and captive situations (Deberdt & Scherer 2007).

Pecari tajacu and *Tayassu pecari*, also known as "cateto" and "queixada", respectively, are wild animals earlier believed to be related to the genus *Sus* and reclassified as genera *Pecari* and *Tayassu* into the *Tayassuidae* family (Taber et al. 2011). *Sus scrofa*, *Pecari tajacu*, and *Tayassu pecari* belong to the same order (*Artiodactyla*) and largely distributed in distinct geographical regions of Latin America.

The health status of South American wild boar populations in regards to porcine picornavirus natural infection is not known. Due to the increase in wild boar populations in Brazil, the role these animals may play as reservoirs for viral infectious diseases, and the recently reported endemic circulation of porcine enteric picornaviruses in Brazilian pig herds (Donin et al. 2014), this study aimed to investigate the occurrence of natural infection by PTV, PSV, and EV-G from the wild boars of Paraná state, Brazil. Additionally, these porcine enteric picornaviruses were evaluated in *Pecari tajacu* and *Tayassu pecari*, both generally called peccaries, in order to investigate a possible alternative host species for these viruses.

MATERIALS AND METHODS

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

Thirty-six fecal samples from wild animals of Paraná state, southern Brazil, were evaluated. Young (2 to 7 months old, $n=14$) and adult (2 to 4 years old, $n=8$) asymptomatic wild boars living on a farm (25°27'18.5"S; 54°25'41.8"W) were sampled in June, 2013. The farm was licensed by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources - IBAMA (registration number 02017019336/97-06). *Pecari tajacu* ($n=5$) and *Tayassu pecari* ($n=9$) animal species with ages ranging 6 to 8 months old were sampled on a zoo located in the Natural Reserve Park of Cascavel city (24°57'21"S, 53°27'18"W) in March, 2014. The animals were maintained in captivity, had no contact with domestic pigs, and were bred in a livestock-like management system, following the requirements commonly applied to commercial pig herds in Brazil. Aliquots of the collected fecal samples were properly labelled and sealed and stored at -80°C until used for analysis.

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

RNA was extracted using a combination of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) and silica/guanidinium isothiocyanate nucleic acid extraction methods (Boom et al. 1990, Alferi et al. 2006). The RNA was eluted in 50 µl of ultra-pure RNase-free diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated sterile water and immediately submitted to a reverse transcription reaction (RT) assay. One porcine enteric picornavirus positive fecal sample (BRA/UEL3/13, GenBank accession numbers KF410644 and KF410645), and an aliquot of ultrapure autoclaved water were included as positive and negative controls, respectively, during the nucleic acid extraction and the following procedures.

Polymerase chain reaction (PCR) and nested-PCR (n-PCR) assays were performed using primers for each of the viruses, targeting the 5'-non-translated region (5'-NTR) of the porcine enteric picornavirus genomes (Krumbholz et al. 2003). The technique was performed as described previously (Krumbholz et al. 2003), with modifications (Doin et al. 2014). The expected fragment lengths of n-PCR amplified products were 158 bp (PTV), 212 bp (PSV), and 313 bp (EV-G).

One amplified product in the n-PCR assay for each of the viruses was randomly selected for sequencing and phylogenetic analysis. The n-PCR amplicons were purified by GFX™ PCR DNA and the Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Little Chalfont, UK), quantified with a Qubit™ Fluorometer (Invitrogen™ Life Technologies, Eugene, OR, USA), and sequenced in both directions with forward and reverse primers in an ABI 3500 Genetic Analyser with the BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). Sequence quality analyses and consensus nucleotide (nt) sequences were assembled using the Phred/Phrap/CAP3 software (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Similarity searches were performed with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool - BLAST software (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A phylogenetic tree, based on nucleotides, was obtained using MEGA version 6.05 (Tamura et al. 2013) by the maximum likelihood statistical method based on the kimura two-parameter model, which provided statistical support via bootstrapping with 1,000 replicates. A sequence identity matrix was performed using

the BioEdit software version 7.1.11 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

RESULTS

Porcine enteric picornaviruses were detected in 12 of the 22 wild boar fecal samples analyzed. Considering all of the samples, EV-G was detected most frequently (50%, 11/22), followed by PTV (45.5%, 10/22). PSV was the least (18.2%, 4/22) common virus present in the fecal samples evaluated and was not detected in the adult wild boar group.

Double PTV and EV-G (22.7%, 5/22) and triple PTV, PSV, and EV-G (18.2%, 4/22) infections were more frequently detected, followed by EV-G (9.1%, 2/22) as a single infection. Regarding the different ages, 2- to 7-month-old wild boars presented with a higher frequency (64.3%, 9/14) of enteric picornaviruses than animals aged 2 to 4 years-old (37.5%, 3/8). The results are summarized in Table 1. Fecal samples from *Pecari tajacu* and *Tayassu pecari* tested negative for the 3 viruses.

Table 1. Single and mixed infections with porcine teschovirus (PTV), porcine sapelovirus (PSV), and enterovirus G (EV-G) detected by n-PCR assays from fecal samples of wild boars (*Sus scrofa scrofa*) in Paraná state, Brazil

Porcine enteric picornaviruses	Age group		Total (n=22)
	Young (2 to 7 months old) n=14	Adult (2 to 4 years old) n=8	
PTV	01	-	01
PSV	-	-	-
EV-G	-	02	02
PTV + PSV	-	-	-
PTV + EV-G	04	01	05
PSV + EV-G	-	-	-
PTV + PSV + EV-G	04	-	04
Total	09	03	12

The sequencing of one amplicon per each virus confirmed the specificity of the amplified products. The fragment sizes of amplicons were 157 nt for PTV (BRA/UEL-WB01/13, nt sequences <200 bp, therefore not submitted to the GenBank and available at the Figure legend herein), 211 nt for PSV (BRA/UEL-WB20/13, GenBank accession number KJ187770), and 313 for EV-G (BRA/UEL-WB40/13, GenBank accession number KJ187771).

Porcine enteric picornavirus nt sequences in this study and others available in GenBank presented similarities varying from 98.4 to 100% for PTV, 92.4% to 96.2% for PSV, and 87.1 to 99.2 % for EV-G. The similarities of sequences herein with other nt sequences from PTV, PSV, and EV-G Brazilian field strains previously reported varied from 97.7% to 98.4% for PTV, 95.4% for PSV, and 99.2% to 100% for EV-G. The phylogenetic tree formed 3 clusters, with each of the porcine enteric picornavirus strains from wild boars of Brazil clustered together with their related viruses. The different serotypes of PTV, PSV, and EV-G evaluated in this study are presented in the phylogenetic tree, with the GenBank accession number of each of the virus sequence presented in parentheses (Fig.1).

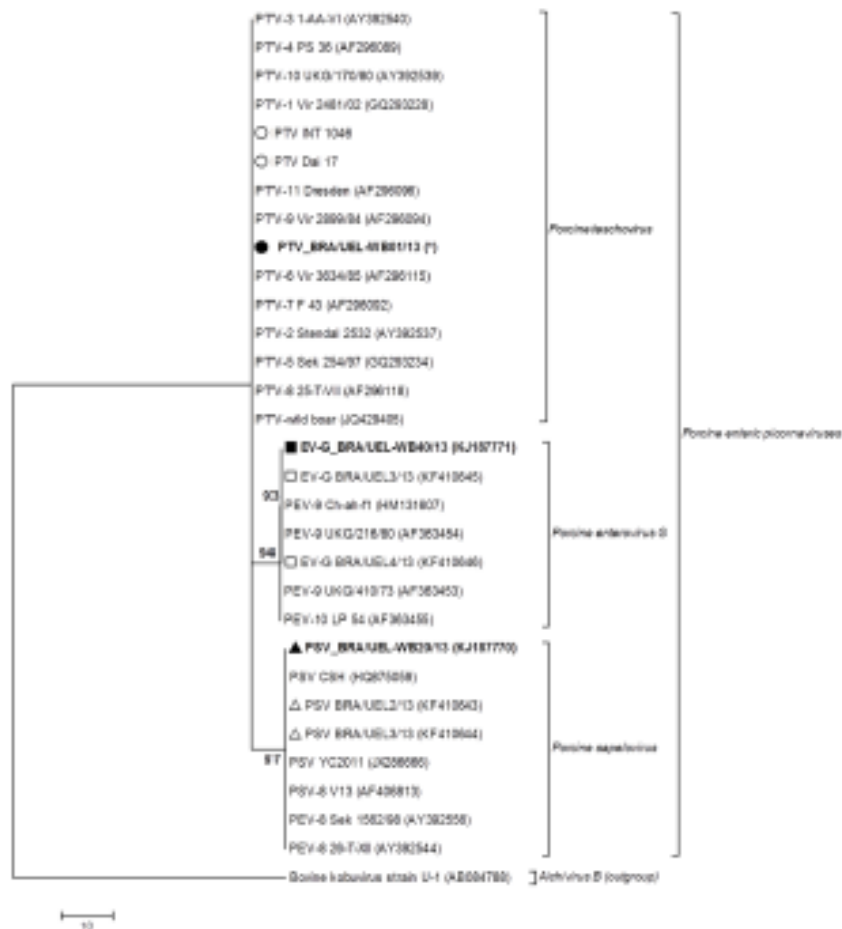


Fig.1. Maximum likelihood phylogenetic tree construction using the kimura two-parameter model based on the partial (130 nt) 5'-non-translated region of porcine enteric picornavirus strains available in GenBank, previously published sequences of Brazilian strains (Indicated by ○ - PTV, △ - PSV, and □ - EV-G) and Brazilian PTV (● BRA/UEL-WB01/13), PSV (▲ BRA/UEL-WB20/13), and EV-G (■ BRA/UEL-WB40/13) wild boar strain sequences in this study. A bovine kobuvirus nt sequence was used as the outgroup. The GenBank accession numbers of the representative sequences and Brazilian strains presented herein are indicated in parentheses. Bootstrap values determined in 1,000 replications. (*) refer to PTV nt sequence < 200 bp; this PTV Brazilian sequence is: GAAA-GACCTGCTCTGGCGGAGCTAAAGCGCAATTGTCACCAAGTATTGCACCAATGGTGGCGACAGGGTACAGAAGAGCAAGTACTCCTGACTGGG-CAATGGGACTGCATTGCATATCCCTAGGCACCTATTGAGATTCTCTGGGGCCACCAGC.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first molecular report of porcine enteric picornaviruses in wild boars from a South American country. The genetic relationship of the PTV, PSV, and EV-G strains from Brazilian wild boars with other sequences, including different serotypes of these viruses, was demonstrated in the phylogenetic tree. The detection of the three porcine enteric picornaviruses was performed for the highly conserved region of the 5'-NTR of the virus genomes and the primer sets used were suitable for specific detection and differentiation of these three porcine enteric picornaviruses. However, a genomic region under higher selection pressure, such as VP1 gene, should be more useful for deeper phylogenetic analyses and classification of the Brazilian wild-boar strains herein.

The overall frequencies of each virus detected herein are similar to a study performed in the Czech Republic, in which EV-G was most commonly detected, followed by PTV and PSV in the 72 fecal samples evaluated from wild boars up to 1 year of age (Prodělalová 2012). Considering single and mixed infections, the results of both of these studies (Prodělalová 2012) are also convergent, with PTV and EV-G double infections detected in higher frequencies, followed by the triple viral infections. In both studies, PSV was detected with the least frequency. However, we are aware that this is a limited study and a higher number of samples should be evaluated for an adequate comparison with results from other studies.

A study performed in Spain reported that PTV was more frequently detected than PSV and, as it was observed in the

results of the present study, single infections by PSV were not identified (Cano-Gómez et al. 2013). Despite some differences in the PCR techniques, protocols, and ages of the evaluated animals in the two previous reports (Prodělalová 2012, Cano-Gómez et al. 2013) and in this study, the results are based on molecular assays that target the 5'-NTR region of the porcine enteric picornavirus' RNA. The similarities among the results presented herein, in the Czech and Spanish studies may indicate that wild boars are more susceptible to infection by EV-G and PTV. In addition, Boros et al. (2012a) proposed a novel EV-G genotype, provisionally named PEV-15, after characterizing the complete genome sequence of an EV-G strain from a wild boar. This same research group also suggested that there may be PTV strains well-adapted or specific to wild boar host species (Boros et al. 2012b).

The age-dependent prevalence of porcine enteric picornavirus infections is not well defined. Based on results from domestic pigs, animals of all ages are susceptible to enteric picornavirus infections. However, the infection frequency of these viruses varies within the age groups. Boros et al. (2011) evaluated fecal samples of 10-day-old, 4-week-old, and 3-month-old pigs for EV-G and detected positive results only in the younger age group. On the other hand, the investigation of EV-G infection in pigs with ages varying from 4 to 26 weeks detected that 10- to 15-week-old animals were more frequently infected with this viral species (Yang et al. 2013).

Another study investigated PTV, PSV, and EV-G in suckling (< 4 weeks of age), post-weaning (4-12 weeks of age), slaughter (6 months of age), and adult pigs and detected the 3 viruses in all age groups, except for PSV, which was not detected in adult animals (Prodělalová 2012). In contrast, a Brazilian study reported the 3 viruses in post-weaning pigs (4-8 weeks old) but did not detect PSV in suckling piglets (1-3 weeks old) (Donin et al. 2014). Co-infections with 2 or 3 porcine enteric picornaviruses were common in the different age groups (Prodělalová 2012, Cano-Gómez et al. 2013, Donin et al. 2014).

Age-related studies of wild boar enteric picornavirus infections are rare, and the results from this animal species must be compared with domestic pig-based data, which are also limited. The present study detected PTV, PSV, and EV-G more frequently in animals up to 7 months of age relative to adult (2- to 4-year-old) wild boars. Another research group reported high frequencies of positive results for EV-G and PTV infections in 6- and 8-week-old wild boars (Boros et al. 2012a, Boros et al. 2012b). Due to the lack of data, the results from these studies represent supplementary information that should be used in further age distribution investigations of porcine enteric picornavirus infections in wild boars.

Sus scrofa, *Pecari tajacu*, and *Tayassu pecari* are phenotypically and behaviorally similar and largely distributed in distinct Latin American regions. For these reasons, peccaries were evaluated as possible alternative host species for porcine enteric picornaviruses. Peccaries tested negative for the viruses and in this study they did not represent infection reservoirs.

It is believed that wild boars were largely introduced into Brazilian territory in the beginning of 1990s through the border with Uruguay, possibly motivated by food demands or due to clandestine import for breeding reasons. In that same decade, wild boars were imported from Europe and Canada, which were also intended for breeding. However, some animals escaped from captivity and, currently, their offspring are still free living. Despite the efforts of the Brazilian government to control the growth of the wild boar population, this animal species is currently present in many states of Brazil, living free or in captivity (Deberdt & Scherer 2007).

Wild boars were noted to be possible infectious disease sources for livestock and/or humans (Ruiz-Fons et al. 2008, Meng et al. 2009); some of these diseases are included in the World Organization for Animal Health's (OIE) list of notifiable diseases and infections (OIE 2014). Many of the reported wild boar virus infections, such as HEV, PoRV, and porcine influenza A virus are known to infect other animal species and are considered important zoonotic diseases (Ruiz-Fons et al. 2008, Meng et al. 2009, Okadera et al. 2013, Biondo et al. 2014). Therefore, the potential risks of disease transmission among wild animals and livestock and/or the human population cannot be ignored.

CONCLUSIONS

The expansion and intensification of livestock production systems requires the constant surveillance of emerging and reemerging infectious diseases.

The introduction of microorganisms associated with wild animals in livestock-based farming systems, the interspecies transmission due to increased contact between domestic and wild animals, and the adaptation (genetic mutation) of pathogens to alternative animal species are factors that highlight the importance of the molecular epidemiological monitoring of enteric microbial and potential pathogens in farm animals.

To the authors' knowledge, this study represents the first molecular screening for PTV, PSV, and EV-G from these wild animal species of Latin America.

The surveillance of infectious diseases in wildlife species may positively impact animal welfare, livestock production, and the environment and public health.

Acknowledgements. The authors are grateful to Anderson L. Carvalho, G Jefferson A. Silva, and Angelica Schmeig for their collaboration. We would like to thank the following Brazilian Institutes for financial support: the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES), Financing of Studies and Projects (FINEP), and the Araucária Foundation (FAP/PR). Alfieri A.A., Alfieri A.F., and Leme R.A. are recipients of CNPq fellowships.

REFERENCES

- Alfieri A.A., Parazzi M.E., Takiuchi E., Médici K.C. & Alfieri A.F. 2006. Frequency of group A rotavirus in diarrhoeic calves in Brazilian cattle herds, 1998-2002. *Trop. Anim. Health Prod.* 38:521-526.
- Bangari D.S., Pogranichny R.M., Gillespie T. & Stevenson G.W. 2010. Genotyping of porcine teschovirus from nervous tissue of pigs with and without poliomyelitis in Indiana. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:594-597.
- Bieber C. & Ruf T. 2005. Population dynamics in wild boar *Sus scrofa*: eco-

- logy, elasticity of growth rate and implications for the management of pulsed resource consumers. *J. Appl. Ecol.* 42:1203-1213.
- Biondo R, Schaefer R, Gava D, Cantão ME, Silveira S, Moraes MAZ, Ciaci-Zanella JR & Barcellos DE.S.N. 2014. Genomic analysis of influenza A virus from captive wild boars in Brazil reveals a human-like H1N2 influenza virus. *Vet. Microbiol.* 168:34-40.
- Boom R, Sol C.J, Sallmans M.M, Jansen C.L, Wertheim-van Dillen P.M. & Van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 28:495-503.
- Boros A, Nemes C, Pankovics P, Biró H, Kapusinszky B, Delwart E. & Reuter G. 2012a. Characterization of a novel porcine enterovirus in wild boars in Hungary. *Arch. Virol.* 157:981-986.
- Boros A, Nemes C, Pankovics P, Kapusinszky B, Delwart E. & Reuter G. 2012b. Porcine teschovirus in wild boars in Hungary. *Arch. Virol.* 157:1573-1578.
- Boros A, Pankovics P & Reuter G. 2011. Characterization of a novel porcine enterovirus in domestic pig in Hungary. *Infect. Genet. Evol.* 11:1096-1102.
- Buitrago D, Cano-Gómez C, Agüero M, Fernandez-Pacheco P, Gómez-Tejedor C. & Jiménez-Clavero M.A. 2010. A survey of porcine picornaviruses and adenoviruses in fecal samples in Spain. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:763-766.
- Cano-Gómez C, García-Casado M.A, Sorriquer R, Palero F. & Jiménez-Clavero M.A. 2013. Teschoviruses and sapeloviruses in faecal samples from wild boar in Spain. *Vet. Microbiol.* 165:115-122.
- Cano-Gómez C, Palero F, Buitrago M.D, García-Casado M.A, Fernández-Pinero J, Fernández-Pacheco P, Agüero M, Gómez-Tejedor C. & Jiménez-Clavero M.A. 2011. Analyzing the genetic diversity of teschoviruses in Spanish pig populations using complete VP1 sequences. *Infect. Genet. Evol.* 11:2144-2150.
- Deberdt A.J. & Scherer S.B. 2007. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. *Braz. J. Nature Conservation* 5:31-44.
- Deng MY, Millon M, Jacques-Simon R, Flanagan JK, Bracht AJ, Carrillo C, Barrette RW, Fabian A, Mohamed F, Moran K, Rowland J, Swenson S.L, Jenkins-Moore M, Koster L, Thomson B.V, Mayr G, Pyburn D, Morales P, Shaw J, Burrage T, White W, McIntosh M.T. & Metwally S. 2012. Diagnosis of Porcine teschovirus encephalomyelitis in the Republic of Haiti. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24:671-678.
- Donin D.G, de Arruda Leme R, Alfieri A, Alberton G. & Alfieri A. 2014. First report of Porcine teschovirus (PTV), Porcine sapelovirus (PSV) and Enterovirus G (EV-G) in pig herds of Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 46:523-528.
- ICTV 2013. International Committee on Taxonomy of Viruses <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>> Accessed on 3 June 2014.
- Kaku Y, Murakami Y, Sarai A, Wang Y, Ohashi S. & Sakamoto K. 2007. Antigenic properties of porcine teschovirus 1 (PTV-1) Taiwan strain and molecular strategy for serotyping of PTVs. *Arch. Virol.* 152:929-940.
- Kaku Y, Sarai A. & Murakami Y. 2001. Genetic reclassification of porcine enteroviruses. *J. Gen. Virol.* 82: 417-424.
- Krumbholz A, Dauber M, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Knowles N.J, Stelzner A. & Zell R. 2002. Sequencing of porcine enterovirus groups II and III reveals unique features of both virus groups. *J. Virol.* 76:5813-5821.
- Krumbholz A, Wurm R, Scheck O, Birch-Hirschfeld E, Egerer R, Henke A, Wutzler P. & Zell R. 2003. Detection of porcine teschoviruses and enteroviruses by LightCycler real-time PCR. *J. Virol. Methods* 113:51-63.
- La Rosa G, Muscillo M, Di Grazia A, Fontana S, Iaconelli M. & Tolla M. 2006. Validation of RT-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses. *J. Vet. Med. B* 53:257-265.
- Lan D, Ji W, Yang S, Cui L, Yang Z, Yuan C. & Hua X. 2011. Isolation and characterization of the first Chinese porcine sapelovirus strain. *Arch. Virol.* 156:1567-1574.
- Lin W, Cui S. & Zell R. 2012. Phylogeny and evolution of porcine teschovirus B isolated from pigs in China with reproductive failure. *Arch. Virol.* 157:1387-1391.
- Meng X.J, Lindsay D.S. & Srinanganathan N. 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364:2697-2707.
- Moon H.-J, Song D, Seon B.H, Kim H.-K, Park S.-J, An D.-J, Kim J.-M, Kang B.-K. & Park B.-K. 2012. Complete genome analysis of porcine enterovirus B isolated in Korea. *J. Virol.* 86:10250.
- OIE 2014. World Organisation for Animal Health. <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=15389> <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=15161> <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapFullEventReport&reportid=15288> Accessed on 13 Junho 2014.
- Okadera K, Abe M, Ito N, Morikawa S, Yamazaki A, Masatani T, Nakagawa K, Yamaoka S. & Sugiyama M. 2013. Evidence of natural transmission of group A rotavirus between domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 20:54-60.
- Prošćalová J. 2012. The survey of porcine teschoviruses, sapeloviruses and enteroviruses B infecting domestic pigs and wild boars in the Czech Republic between 2005 and 2011. *Infect. Genet. Evol.* 12:1447-1451.
- Ruiz-Fons F, Segalés J. & Gortázar C. 2008. A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role. *Vet. J.* 176:158-169.
- Salles M.W.S., Scholtes S.F.E, Dauber M, Strebellow G, Wojnarowicz C, Hassard L, Acton A.C. & Bollinger T.K. 2011. Porcine teschovirus poliointerovirus in western Canada. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23: 367-373.
- Shan T, Li L, Simmonds P, Wang C, Mosser A. & Delwart E. 2011. The fecal virome of pigs on a high-density farm. *J. Virol.* 85:11697-11708.
- Sozzi E, Barbieri I, Lavezza A, Lelli D, Moreno A, Canelli E, Bugnotti M. & Cordill P. 2010. Molecular characterization and phylogenetic analysis of VP1 of porcine enteric picornaviruses isolates in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 57:434-442.
- Taber A, Altrichter M, Beck H. & Gorgora J. 2011. Family *Tayassuidae* (Peccaries), p.308-320. In: Wilson D.E. & Mittermeier R.A. (Eds). *Handbook of the Mammals of the World*. Vol.2. Lynx Edicions, Barcelona.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipaki A. & Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30:2725-2729.
- Ventura A, Gonzalez W, Barrette R, Swenson S, Bracht A, Rowland J, Fabian A, Moran K, Mohamed F, O'Hearn E, Jenkins-Moore M, Toms D, Shaw J, Morales P, Pyburn D, Carrillo C, Mayr G, McIntosh M. & Deng M. 2013. Virus and antibody diagnostics for swine samples of the Dominican Republic collected in regions near the border to Haiti. *ISRN Virology* 2013:1-7.
- Yang S, Wang Y, Shen Q, Zhang W. & Hua X. 2013. Prevalence of porcine enterovirus 9 in pigs in Middle and Eastern China. *Virol. J.* 10:99.
- Zell R, Dauber M, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Prager D. & Wurm R. 2001. Porcine teschoviruses comprise at least eleven distinct serotypes: molecular and evolutionary aspects. *J. Virol.* 75:1620-1631.
- Zell R, Krumbholz A, Henke A, Birch-Hirschfeld E, Stelzner A, Doherty M, Hoey E, Dauber M, Prager D. & Wurm R. 2000. Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR: differentiation of GPE groups I-III with specific primer sets. *J. Virol. Methods* 88:205-218.
- Zhang W, Yang S, Shen Q, Ren L, Shan T, Wei J, Cui L. & Hua X. 2012. Complete genome sequence of a novel porcine enterovirus strain in China. *J. Virol.* 86:7008-7009.

5. CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

- A infecção por TV-A, SV-A e EV-G está disseminada em rebanhos de suínos domésticos de importantes regiões brasileiras (Sul, Sudeste e Centro-oeste) produtoras de suínos.
- Infecções singulares e mistas pelos PEVs são comuns em animais de 1 a 8 semanas de idade.
- Suínos de todas as faixas etárias estão suscetíveis à infecção pelo TV-A em maior proporção, seguido pelo EV-G e SV-A.
- A frequência de infecção por PEVs aumenta de acordo com o aumento da idade dos animais.
- Javalis apresentam-se mais frequentemente infectados por EV-G, seguido do TV-A e em menor frequência, pelo SV-A.
- Javalis jovens (2 a 7 meses) apresentam maior frequência de infecção por PEVs do que os animais mais velhos (2 a 4 anos).
- Neste estudo, catetos e queixadas não foram considerados reservatórios da infecção para os PEVs.
- TV-A, SV-A e EV-G devem ser incluídos no diagnóstico diferencial de enfermidades que cursam com sinais clínicos semelhantes aos manifestados por estes agentes virais.

APÊNDICES

Sequências Genômicas**PTV_BRA/UEL1/11**

TTGAAAGACCTGCTCTGGCGCGAGCTAAAGCGCAATTGTCACCAGGTATTGCACC
AATGGTGGCGACAGGGTACAGAAGAGCAAGTACTCCTGACTGGGTAATGGGACT
GCATTGCATATCCCTAGGCACCCATTGAGATTTCTCTGGGGCCCACCAG

PTV_BRA/UEL3/13

GAAAGACCTGCTCTGGCGCGAGCTAGAGCGCAATTGTCACCAGGTATTGCACCAA
TGGTGGCGACAGGGTACAGAAGAGCAAGTACTCCTGACTGGGTAATGGGACTGC
ATTGCATATCCCTAGGCATCTATTGAGATTTCTCTGGGGCCCACCAGC

PSV_BRA/UEL2/13 (*GenBank accession number* KF410643)

TGGCAGTAGCGTGGCGAGCTATGGAAAATCGCAATTGTCGATAGCCATGTCAGT
GACGCGCTTCGGCGTGCTCCTTTGGTGATTTCGGCGACTGGTTACAGGAGAGTAGG
CAGTGAGCTATGGGCAAACCTCTACAGTATTACTTAGAGGGAATGTGCAATTGAG
ACTTGACGAGCGTCTCCTAGAGATGTGGCGCATGCTCTTGGCATTAA

PSV_BRA/UEL3/13 (*GenBank accession number* KF410644)

TGGCAGTAGCGTGGCGAGCTATGGAAAATCGCAATTGTCGATAGCCATGTCAGT
GACGCGCTTCGGCGTGCTCCTTTGGTGATTTCGGCGACTGGTTACAGGAGAGTAGG
CAGTGAGCTATGGGCAAACCTCTACAGTATTACTTAGAGGGAATGTGCAATTGAG
ACTTGACGAGCGTCTCCTAGAGATGTGGCGCATGCTCTTGGCATTAA

EV-G_BRA/UEL3/13 (*GenBank accession number* KF410645)

CAAGCACTTCTGTTTCCCCGGACCTAGTAGTGATAGGCTGTACCCACGGCCGAAG
ATGAACCCGTCCGTTATCCGGCCAGCTACTTCGAGAAGCCTAGTAACATCAAAGA
TCTGTCTTGGCGTTTCGCTCAGCGCGTTCCCCCCGCGTAGATCGGGCTGATGGGTC
TCCGCATACCCACGGGCGACCGTGGCGGAGGCCGCGTGGCGGGCCCGCCTATGG
CGAAAGCCATAGGACGCCATTTTCAGTGACAGGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
GTTGGTAGTCCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAA

EV-G_BRA/UEL4/13 (GenBank accession number KF410646)

CAAGCACTTCTGTTTCCCCGGACCTAGTAGTGATAGGCTGTACCCACGGCCGAAG
ATGAACCCGTCCGTTATCCGGCCAGCTACTTCGAGAAGCCTAGTAACATCAAAGA
TCTGTTTTGGCGTTTCGCTCAGCGCGTTCCCCCGCGTAGATCGGGCTGATGGGTC
TCCGCATACCCACGGGCGACCGTGGCGGAGGCCGCGTGGCGGGCCCGCCTATGG
CGAAAGCCATAGGACGCCATTTTCAGTGACAGGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
GTTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAA

PTV_BRA/UEL-WB01/13

GAAAGACCTGCTCTGGCGCGAGCTAAAGCGCAATTGTCACCAGGTATTGCACCAA
TGGTGGCGACAGGGTACAGAAGAGCAAGTACTCCTGACTGGGCAATGGGACTGC
ATTGCATATCCCTAGGCACCTATTGAGATTTCTCTGGGGCCCCACCAGC

PSV_BRA/UEL-WB20/13 (GenBank accession number KJ187770)

TGGCAGTAGCGTGGCGAGCTATGGAAAAATCGCAATTGTCGATAGCCATGTTAGT
GACGCGCTTCGGTGTGCTCCATTGGTGATTTCGGCGACTGGTTACGGGAGAGTAGG
CAGTGAGCTATGGGTAAACCTCTACAGTATTACTTAGAGGGAATGTGCAATTGAG
GCTTGACGAGCGTCTCCCTGAGATGTGGCGCATGCTCTTGGCATTAA

EV-G_BRA/UEL-WB40/13 (GenBank accession number KJ187771)

CAAGCACTTCTGTTTCCCCGGACCTAGTAGTGATAGGCTGTACCCACGGCCGAAG
ATGAACCCGTCCGTTATCCGGCCAGCTACTTCGAGAAGCCTAGTAACATCAAAGA
TCTGTCTTGGCGTTTCGCTCAGCGCGTTTCCCCCGCGTAGATCGGGCTGATGGGTC
TCCGCATACCCACGGGCGACCGTGGCGGAGGCCGCGTGGCGGGCCCGCCATGG
CGAAAGCCATGGGACGCCATTTTCAGTGACAGGGTGTGAAGAGCCTATTGAGCTA
GTTGGTAGTCCTCCGGCCCCCTGAATGCGGCTAATCCTAA

ANEXOS

Lista de Reagentes

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

27. Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) P.M. 155,99 (Reagen[®])
28. Fosfato de sódio dibásico anidro (Na_2HPO_4) P.M. 141,96 (Synth[®])
29. Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) P.M. 180,16 (Reagen[®])
30. Hidróxido de sódio, P.A. (NaOH) P.M. 40,00 (Dinâmica[®])
31. Hidroximetil amino metano – TRIS 99% P.M. 121,14 (Inlab[®])
32. Isotiocianato de guanidina P.M. 118,16 (Gibco BRL[®])
33. Metanol P.A. (CH_3OH) P.M. 32,04 (Allkimia[®])
34. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) TV-A *Forward*/PCR – Pev-1a (*forward*; 5′-AGTTTTGGATTATCTTGGCCC -3′; nucleotídeo (nt) 76-97) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
35. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) TV-A *Reverse*/PCR – Pev-1e (*reverse*; 5′-CGCGACCCTGTCAGGCAGCAC -3′; nucleotídeo (nt) 391-371) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
36. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) TV-A *Forward/nested*-PCR – Pev-1c (*forward*; 5′-TGAAAGACCTGCTCTGGCGGAG -3′; nucleotídeo (nt) 178-200) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
37. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) TV-A *Reverse/nested*-PCR – Pev-1d (*reverse*; 5′-GCTGGTGGCCCCAGAGAAATCTC -3′; nucleotídeo (nt) 335-312) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
38. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) SV-A *Forward*/PCR – Pev-8e (*forward*; 5′-CTTAAGGTGGTTGTATCCCCTAC-3′; nucleotídeo (nt) 23-45) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
39. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) SV-A *Reverse*/PCR – Pev-8f (*reverse*; 5′-TTCAACTGACTATACTAGTTACAGG -3′; nucleotídeo (nt) 435-411) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
40. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) SV-A *Forward/nested*-PCR – Pev-8g (*forward*; 5′-ATGGCAGTAGCGTGGCGAGCTAT -3′; nucleotídeo (nt) 131-153) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
41. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) SV-A *Reverse/nested*-PCR – Pev-8h (*reverse*; 5′-GTAATGCCAAGAGCATGCGCCA-3′; nucleotídeo (nt) 342-321) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
42. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) EV-G *Forward*/PCR – Pev-9a (*forward*; 5′-GTACCTTTGTACGCCTGTTTTA -3′; nucleotídeo (nt) 96-117) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])

43. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) EV-G *Reverse*/PCR – Pev-9b (*reverse*; 5'-ACCCAAAGTAGTCGGTTCCGC -3'; nucleotídeo (nt) 586–566) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
44. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) EV-G *Forward/nested*-PCR – Pev-9c (*forward*; 5'-CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG -3'; nucleotídeo (nt) 197–217) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
45. Oligonucleotídeo iniciador (*primer*) EV-G *Reverse/nested*-PCR – Pev-9e (*reverse*; 5'-GTTAGGATTAGCCGCATTCAGGGG -3'; nucleotídeo (nt) 509–486) Krumbholz *et al.* (2003) - 200 pmol (*Invitrogen Life Technologies*[®])
46. PCR-*buffer* (10x) (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl) (*Invitrogen Life Technologies*[®])
47. *Platinum Taq DNA Polymerase recombinant 500 units* (*Invitrogen Life Technologies*[®])
48. Oligo (dT)₁₂₋₁₈ *Primer*
49. *QuantITTM dsDNA BR assay kit* (*Invitrogen Life Technologies*[®])
50. Sacarose, P.A. – sucrose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.M. 342,31 (*Reagen*[®])
51. Triton x-100
52. Vermelho de fenol (C₁₉H₁₄O₅S) P.M. 354,38 (*Reagen*[®])

Soluções e Tampões

- **Diluição dos primers**

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

- *Primer forward- TV-A PCR*

Sequência: 5'- AGTTTTGGATTATCTTGGCCC - 3'

Posição: 76-97

Concentração: 30,6 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$30600 / 200 = 153$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 153 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

- *Primer reverse- TV-A PCR*

Sequência: 5'- CGCGACCCTGTCAGGCAGCAC - 3'

Posição: 391-371

Concentração: 29,7 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$29700 / 200 = 148,5$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 148,5 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

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

- *Primer forward- TV-A nested-PCR*

Sequência: 5'- TGAAAGACCTGCTCTGGCGCGAG - 3'

Posição: 178-200

Concentração: 24,8 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$24800 / 200 = 124$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 124 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer mãe* (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

- *Primer reverse- TV-A nested-PCR*

Sequência: 5'- GCTGGTGGCCCCAGAGAAATCTC - 3'

Posição: 335-312

Concentração: 32,8 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$32800 / 200 = 164$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 164 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer mãe* (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

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

- *Primer forward- SV-A PCR*

Sequência: 5'- CTTAAGGTGGTTGTATCCCCTAC - 3'

Posição: 23-45

Concentração: 30,7 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$30700 / 200 = 153,5$$

Primer mãe (200 pmol/ μ L): ressuspender em 153,5 μ L de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/ μ L): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

- *Primer reverse-SV-A PCR*

Sequência: 5'- TTCAACTGACTATACTAGTTACAGG - 3'

Posição: 435-411

Concentração: 32,9 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$32900 / 200 = 164,5$$

Primer mãe (200 pmol/ μ L): ressuspender em 164,5 μ L de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/ μ L): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

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

- *Primer forward-SV-A nested-PCR*

Sequência: 5'- ATGGCAGTAGCGTGGCGAGCTAT- 3'

Posição: 131-153

Concentração: 39,7 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$39700 / 200 = 198,5$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 198,5 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

- *Primer reverse- SV-A nested-PCR*

Sequência: 5'- GTAATGCCAAGAGCATGCGCCA - 3'

Posição: 342-321

Concentração: 28,1 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$28100 / 200 = 140,5$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 140,5 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

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

- *Primer forward- EV-G PCR*

Sequência: 5'- GTACCTTTGTACGCCTGTTTTA - 3'

Posição: 96-117

Concentração: 37,1 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$37100 / 200 = 185,5$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 185,5 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

- *Primer reverse- EV-G PCR*

Sequência: 5'- ACCCAAAGTAGTCGGTTCCGC- 3'

Posição: 586–566

Concentração: 40,5 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$40500 / 200 = 202,5$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 202,5 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

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

- *Primer forward-EV-G nested-PCR*

Sequência: 5'- CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG- 3'

Posição: 197–217

Concentração: 28,6 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$28600 / 200 = 143$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 143 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

- *Primer reverse- EV-G nested-PCR*

Sequência: 5'- GTTAGGATTAGCCGCATTCAGGGG - 3'

Posição: 509–486

Concentração: 32,1 nmoles

Data de fabricação: Mar / 2013

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

$$32100 / 200 = 160,5$$

Primer mãe (200 pmol/μL): ressuspender em 160,5 μL de água *MilliQ* autoclavada para obtenção de solução 10x []

Primer uso 1x [] (20 pmol/μL): diluir o *primer* mãe (1:10) em água *MilliQ* autoclavada

- **Diluição de dNTP**

- solução estoque (100 mM) – 100 μL de cada dNTP

- solução uso (10 mM) – 10 μL da solução estoque + 90 μL de água *MilliQ* autoclavada

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

- 25 mL de fenol saturado em água

- 24 mL de clorofórmio

- 1 mL de álcool isoamílico

- **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

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

- **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
- Ajustar o pH (pH 2,0)
- Aliquotar e autoclavar

- **SDS 10%**

- 5 g de dodecil sulfato de sódio – Lauril sulfato de sódio – SDS ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
- água bidestilada q.s.p. 50 mL

- **Solução L6**

- 120 g de isotiocianato de guanidina (GUSCN)
- 100 mL de TRIS-HCl 0,1 M pH 6,4
- 22 mL de EDTA 0,2 M pH 8,0
- 2,6 g de Triton x100

- **Solução L2**

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

- **Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose**

- azul de bromofenol 0,25%
- sacarose – sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) 45%
- água bidestilada q.s.p. 100 mL

- **Tampão de corrida – TBE (Tris – Ácido bórico – EDTA) 10x**

- 107,78 g Tris 0,89 M
- 55,03 g Ácido bórico 0,89 M
- 7,45 g EDTA 0,02 M
- água bidestilada q.s.p. 1 litro
- ajustar o pH (pH 8,4)

- **Tampão Fosfato Salina – PBS**

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

Protocolos de Técnicas

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

1. Suspensão fecal – extração bruta

- 100 µL ou 100 mg de fezes
- 500 µL de PBS
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar a 5000 x g / 3 min
- Utilizar 400 µL do sobrenadante para extração

2. Extração do ácido nucleico

Fase I – Fenol

- 400 µL da suspensão fecal
- Adicionar 40 µL de SDS 10%
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56 °C /20 min
- Centrifugar 10.000 x g /30 s
- Adicionar 400 µL de fenol/clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1)
- Homogeneizar em *vortex*
- Banho-maria 56 °C /15 min
- Homogeneizar em *vortex*
- Centrifugar 10.000 x g /10 min
- Recolher o sobrenadante em outro microtubo de 1,5 mL

Fase II – Sílica / isotiocianato de guanidina

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

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

- **Transcrição reversa, reação em cadeia da polimerase (PCR) e *nested*-PCR**

- *Mix* da Desnaturação

Reagentes	Volume (μL)
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	1
dNTP	1
Água	6
RNA	5
Volume final	13

- *Mix* da RT-PCR

Reagentes	Volume (μL)
<i>Buffer</i> 5 x	4
DTT	2
M-MLV	1
Volume final	7

- *Mix* de PCR e *nested*-PCR para detecção parcial da região 5'NTR dos genomas virais

Reagentes	Volume (μL)	
	PCR	<i>Nested</i>
<i>Buffer</i> 10 x (pH 8,4)	5	5
MgCl ₂	1,5	1,5
dNTP (2,5 mM)	1	1
<i>Platinum</i> [®] <i>Taq DNA Polymerase</i> (5U/ μL)	0,4	0,4
<i>Primer Forward</i> * (20 pmol)	0,5	0,5
<i>Primer Reverse</i> ** (20 pmol)	0,5	0,5
Água	39,1	39,1
cDNA	2	2
Volume final	50	50

- * TV-A: PEV1a (PCR); PEV1c (*nested*-PCR);
- ** TV-A: PEV1e (PCR); PEV1d (*nested*-PCR);
- *SV-A: PEV8e (PCR); PEV8g (*nested*-PCR);
- **SV-A: PEV8f (PCR); PEV8h (*nested*-PCR);
- *EV-G: PEV9a (PCR); PEV9c (*nested*-PCR);
- **EV-G: PEV9b (PCR); PEV9e (*nested*-PCR).

- Ciclo de tempo e temperatura da reação da Desnaturação

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação	65	5

- Ciclos de tempo e temperatura da reação da Transcrição Reversa (RT)

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (min)
Desnaturação	37	50
Inativação	70	15

- Ciclos de tempo e temperatura da PCR e *nested*-PCR

Reação	Temperatura (°C)	Tempo (min)	N° de Ciclos	
			PCR	<i>Nested</i>
Desnaturação	94	5	1	1
Desnaturação	94	1	35	30
Anelamento	55	1	35	30
Extensão	72	1	35	30
Extensão final	72	7	1	1

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

- 1 g de agarose

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

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

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

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

1. Pesar o fragmento excisado do gel em microtubo de 1,5 mL

2. Adicionar 3 µL do *Gel Solubilization Buffer* (L3) para cada 1 mg de gel

3. Incubar o microtubo a 50°C / 15 min, homogeneizando a cada 3 min

4. Centrifugar a 12.000 x g / 30s

5. Transferir amostra solubilizada para um tubo coletor com coluna

6. Centrifugar a 12.000 x g / 1 min

7. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo

8. Adicionar 500 µL do *Wash buffer* (W1) na coluna com tubo coletor

9. Centrifugar a 12.000 x g / 1 min

10. Descartar o filtrado e recolocar a coluna no mesmo tubo

11. Centrifugar a 12.000 x g / 1-2 min

12. Descartar o filtrado e transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL

13. Adicionar 30 µL do *Elution buffer* (E5)

14. Incubar a temperatura ambiente por 1 min.

15. Centrifugar a 12.000 x g / 1 min.

16. Proceder com a etapa de quantificação ou estocar o fragmento de DNA purificado a -20°C.

- **Quantificação de produto de PCR**

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

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

Lista de *softwares*

- *Electropherogram quality analysis* - Phred e CAP3

(<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>)

- *BLAST The Basic Local Alignment Search Tool*

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

- *BioEdit software version 7.1.11*

(<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>)

- *MEGA* versão 5.2.1